

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL

ÉTUDE DE LA FONCTION DES RHO GAP
AU COURS DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE
DU NÉMATODE CAENORHABDITIS ELEGANS

MÉMOIRE
PRÉSENTÉ
COMME EXIGENCE PARTIELLE
DE LA MAÎTRISE EN CHIMIE

PAR
ÉLODIE BOULIER

JUILLET 2010

UNIVERSITÉ DU QUÉBEC À MONTRÉAL
Service des bibliothèques

Avertissement

La diffusion de ce mémoire se fait dans le respect des droits de son auteur, qui a signé le formulaire *Autorisation de reproduire et de diffuser un travail de recherche de cycles supérieurs* (SDU-522 – Rév.01-2006). Cette autorisation stipule que «conformément à l'article 11 du Règlement no 8 des études de cycles supérieurs, [l'auteur] concède à l'Université du Québec à Montréal une licence non exclusive d'utilisation et de publication de la totalité ou d'une partie importante de [son] travail de recherche pour des fins pédagogiques et non commerciales. Plus précisément, [l'auteur] autorise l'Université du Québec à Montréal à reproduire, diffuser, prêter, distribuer ou vendre des copies de [son] travail de recherche à des fins non commerciales sur quelque support que ce soit, y compris l'Internet. Cette licence et cette autorisation n'entraînent pas une renonciation de [la] part [de l'auteur] à [ses] droits moraux ni à [ses] droits de propriété intellectuelle. Sauf entente contraire, [l'auteur] conserve la liberté de diffuser et de commercialiser ou non ce travail dont [il] possède un exemplaire.»

Le savoir sans sagesse est comme du sel sans saveur...

Je dédie ce travail :

*À Celui dont l'amour est inconditionnel, Qui m'a toujours guidée et ne m'a jamais abandonnée, et vers
Qui je pourrais toujours me réfugier.*

*À celui qui m'a redonné espoir, qui m'a sans cesse soutenue surtout dans les moments de doutes et
les périodes les plus difficiles, à toi mon amour.*

*À mes parents, qui ont toujours veillé à nous donner les meilleurs moyens pour faire de bonnes
études.*

À ma sœur, qui peut être fière de ce qu'elle a accompli.

À ma grand-mère, qui m'a donné tant d'affection.

REMERCIEMENTS

Ce travail a été réalisé dans le laboratoire de génomique intégrative et signalisation cellulaire. Pour son accueil dans son laboratoire, sa supervision et ses conseils, je tiens à remercier ma directrice, la Dre S. Jenna.

Cette maîtrise a été financée par les bourses FARE et Pharmaqam. Le projet sur lequel j'ai travaillé a été financé par le CRSNG.

Je remercie également les professeurs du département de biochimie et le professeur M. Abdoulaye Baniré du département d'informatique.

Pour ce qu'ils m'ont appris, je remercie mes collègues de laboratoire : Richard, Sharon, Étienne, Marie-Élaine, Maria, Henri-Michel, Claire, Jérémy. Je remercie également Nhu Ha, ma collègue dans le cours de bioinformatique. Pour leurs aide et conseils, je remercie les techniciens M. Michel Marion et Mme Julie Poirier, les étudiants du 4^{ème} étage du bâtiment CB, et le personnel du magasin de chimie à l'UQAM.

Un immense merci à mon amour, mon mari, pour son infinie patience et ses précieux encouragements. J'ai tant appris avec toi et j'ai encore tant à apprendre.

Mes remerciements se tournent vers ma sœur et mes parents, qui m'ont encouragé à venir étudier au Québec (la « belle province » de mon père) et qui m'ont soutenu et écouté lors de mes découragements.

Un grand merci à un de mes oncles pour m'avoir conseillé d'aller plus loin dans mes études. Merci à toute ma famille, en particulier à Amandine.

Pour vos encouragements et votre amitié, je remercie chaleureusement mes amis, particulièrement Salima Akam et tous ceux qui habitent Montréal (incluant ceux qui habitent temporairement hors de Montréal), thank you so much dear friends !

Je remercie Mme Barfetti (mon professeur de biologie au lycée), qui m'a donné l'envie de faire de la recherche en biologie, et qui à mes yeux était la meilleure pédagogue que j'ai eu la chance d'avoir en classe.

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES FIGURES.....	xi
LISTE DES TABLEAUX.....	xiii
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	xiv
RÉSUMÉ.....	xv
PREMIÈRE PARTIE	
INTRODUCTION.....	1
CHAPITRE 1	
LES GTPASES DE LA FAMILLE DES RHO.....	2
1. SIGNALISATION CELLULAIRE.....	2
2. GÉNÉRALITÉS.....	2
3. STRUCTURE.....	3
4. EXPRESSION.....	5
5. MODIFICATIONS POST-TRADUCTIONNELLES.....	5
6. LOCALISATION.....	7
7. CYCLE D'ACTIVATION ET D'INACTIVATION.....	8
7.1. Régulateurs.....	9
7.1.1. GTPase activating proteins (GAP).....	10
7.1.2. Guanine nucleotide exchange factors (GEF).....	12
7.1.3. GDP dissociation inhibitors (GDI).....	14
8. LES FONCTIONS DES RHO GTPASES.....	14
8.1. Cytosquelette d'actine.....	15
8.2. Trafic membranaire.....	15
8.3. Transcription, prolifération et survie cellulaire.....	16
8.4. Stress et hypoxie.....	16
9. PATHOLOGIES HUMAINES ET RHO GTPASES.....	17
9.1. Cancers.....	17
9.2. Retard mental.....	19

9.3.	Autres désordres	21
9.4.	Infections bactériennes	21
CHAPITRE 2		
UN MODÈLE ANIMAL, CAENORHABDITIS ELEGANS		23
1.	LE NÉMATODE CAENORHABDITIS ELEGANS	23
2.	LE DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE CHEZ <i>C. ELEGANS</i>	23
2.1.	Les étapes du développement	23
2.2.	Conservation fonctionnelle des Rho	25
OBJECTIFS DE CE PROJET		29
DEUXIÈME PARTIE		
CARACTÉRISATION DE LA SPÉCIFICITÉ CATALYTIQUE DES RHO GAP ENVERS LES RHO GTPASES		30
CHAPITRE 1		
IDENTIFICATION DE LA SPÉCIFICITÉ DE LIAISON DES RHO GTPASES AVEC LES RHO GAP <i>IN SILICO</i>		32
GÉNÉRATION D'UN MODÈLE PRÉDICTIF D'INTERACTIONS PROTÉIQUES SPÉCIFIQUES ENTRE LES RHO GAP ET LES RHO GTPASES		32
RÉSUMÉ		33
1.	INTRODUCTION	33
2.	MATÉRIELS ET MÉTHODES	35
2.1.	Recensement des interactions Rho GAP-Rho GTPases	35
2.2.	Identification des domaines Rho GAP et générations des fichiers PDB	36
2.3.	Recensement de structures pour contrôler le taux de faux positifs	37
2.4.	Modification du logiciel CE	37
2.5.	Analyse du GOLD Standard, RGS et des échantillons par CE	39
2.6.	Analyse du GOLD Standard et RGS par MAMMOTH et DALI	39
2.7.	Validation du prédicteur	40
3.	RÉSULTATS	41

3.1.	Prédictions des structures 3D	41
3.2.	Détermination du seuil de confiance et validation <i>in silico</i>	41
3.3.	Analyse des prédictions	44
3.4.	Validation du prédicteur	45
4.	DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	47
4.1.	GOLD STANDARD et référence d'interactions.....	47
4.2.	Prédiction des structures 3D	47
4.3.	Pouvoir de prédiction et comparaison avec DALI et MAMMOTH 3	48
4.4.	Perspectives	49

CHAPITRE 2

MISE AU POINT DE LA MÉTHODE D'IDENTIFICATION DE LA SPÉCIFICITÉ DE LIAISON DES RHO GTPASES AVEC LES RHO GAP <i>IN VITRO</i>	50
1. MATÉRIEL ET MÉTHODES	50
1.1. Constructions de plasmides : principe de la technologie Gateway (Invitrogen TM).....	50
1.2. Expression des protéines recombinantes	54
1.3. Lyse des cultures bactériennes des protéines recombinantes	57
1.3.1. Protocole de lyse enzymatique.....	57
1.3.2. Protocole de lyse par sonication.....	59
1.4. Purification et quantification des protéines	59
1.4.1. Rho GTPases recombinantes.....	59
1.4.2. Rho GAP recombinantes.....	60
1.5. Essai de fixation <i>in vitro</i> des GAP sur les GTPases	61
1.6. Électrophorèse en gel SDS PAGE et immunobuvardage	62
2. RÉSULTATS.....	64
2.1. Purification et quantification des protéines	64
2.1.1. Rho GTPases recombinantes.....	64
2.1.2. Rho GAP recombinantes.....	66
2.2. Essai de fixation <i>in vitro</i> des GAP sur les GTPases	67
3. CONCLUSIONS	68

TROISIÈME PARTIE

ÉTUDE DES INTERACTIONS GÉNÉTIQUES ENTRE LES RHO GAP AU COURS DU DÉVELOPPEMENT EMBRYONNAIRE DE *C. ELEGANS IN VIVO*..... 69

CHAPITRE 1

MATÉRIELS ET MÉTHODES 71

1. PRÉPARATION DU MATÉRIEL BACTÉRIOLOGIQUE DESTINÉ AU TRAITEMENT ARNi... 71
 - 1.1. Clonage dans le vecteur pL4440..... 73
 - 1.2. Transformation du pL4440-Rho GAP dans les DH5 α 73
 - 1.3. Purification des pL4440-Rho GAP à partir de cultures de DH5 α et électrophorèse sur gel d'agarose..... 74
 - 1.4. PCR sur les plasmides pL4440-Rho GAP purifiés à partir de cultures de DH5 α 75
 - 1.5. Séquençage sur les plasmides pL4440-Rho GAP purifiés à partir de cultures de DH5 α 76
 - 1.6. Génération des clones bactériens destinés aux traitements ARNi..... 76
 - 1.6.1. Transformation du pL4440-Rho GAP dans les HT115..... 76
 - 1.6.2. Vérification de la transformation des HT115 par les pL4440-Rho GAP 77
2. TRAITEMENTS ARNi EN MILIEU SOLIDE CONTRE LES RHO GAP SUR LES VERS MUTANTS ET SAUVAGES 77
 - 2.1. Souches de vers *C. elegans* utilisées..... 77
 - 2.2. Synchronisation de la population de nématodes..... 78
 - 2.3. Induction de la synthèse d'ARN double brins par les clones bactériens HT115..... 79
 - 2.4. Traitement des animaux synchronisés aux ARNi..... 80
 - 2.5. Analyse du phénotype de létalité embryonnaire..... 80
 - 2.5.1. Observation du développement embryonnaire de *C. elegans* en 4D..... 80
 - 2.5.2. Test de létalité embryonnaire 81

CHAPITRE 2

RÉSULTATS 84

1. PRÉPARATION DU MATÉRIEL BIOLOGIQUE DESTINÉ AUX TRAITEMENTS ARNi 84

1.1.	Électrophorèse sur gel d'agarose des pL4440-Rho GAP purifiés à partir de cultures de DH5 α	86
1.2.	PCR des plasmides purifiés à partir de cultures de DH5 α -pL4440-Rho GAP et d'HT115-pL4440-Rho GAP.....	87
1.3.	Séquençage sur les plasmides pL4440-Rho GAP purifiés à partir de cultures de DH5 α	88
1.3.1.	Purification des plasmides.....	88
1.3.2.	Séquençage.....	90
1.4.	Génération des clones bactériens destinés aux traitements ARNi.....	92
1.4.1.	Vérification de la transformation des HT115 par les pL4440-Rho GAP.....	92
2.	TRAITEMENTS ARNi EN MILIEU SOLIDE CONTRE LES RHO GAP SUR LES VERS MUTANTS ET SAUVAGES.....	94
2.1.	Matrice d'interactions génétiques.....	94
2.2.	Caractérisation des interactions avec la Rho GAP rga-5 au cours du développement embryonnaire de <i>C. elegans</i>	95
2.2.1.	Caractérisation moléculaire de la mutation dans rga-5.....	98
2.2.2.	La mutation de rga-5(ok1498) provoque un arrêt de développement chez <i>C. elegans</i>	99
2.2.3.	Caractérisation de cinq nouvelles interactions avec la Rho GAP rga-5.....	100
CHAPITRE 3		
	DISCUSSION ET CONCLUSIONS.....	105
1.	DISCUSSION.....	105
2.	CONCLUSIONS.....	110
3.	PERSPECTIVES.....	111
QUATRIÈME PARTIE		
	MISE AU POINT D'UNE MÉTHODE À HAUT DÉBIT PERMETTANT DE DÉTERMINER LA LÉTALITÉ EMBRYONNAIRE ET LE STADE D'ARRÊT DU DÉVELOPPEMENT.....	112

CHAPITRE 1

TRAITEMENT ARNI LIQUIDE SUR NÉMATODES TRANSGÉNIQUES

HISTONES::GFP ET ANALYSE EN HAUT DÉBIT 114

RÉSUMÉ..... 115

1. INTRODUCTION..... 115

2. MATERIALS 117

2.1. Generation and Maintenance of RNAi-Expressing Bacterial Clones..... 117

2.2. Transformation of HT115 Bacteria with RNAi Coding Vector 118

2.3. RNAi Treatment of Histone-GFP Expressing Animals..... 119

2.4. Preparation of Eggs from RNAi Treated Animals..... 119

2.5. Analysis of HIS2::GFP Animals Progeny using Flow Cytometry 120

3. METHODS 120

3.1. Generation and Maintenance of RNAi-Expressing Bacterial Clones..... 120

3.2. RNAi Treatment of Histone-GFP Expressing Animals..... 122

3.2.1. Synchronization of Nematode Population..... 122

3.2.2. Induction of ds RNA Synthesis by HT115 Bacterial Clones 124

3.2.3. Treatment of Synchronized Animals with RNAi 125

3.2.4. Preparation of Embryos from RNAi-Treated Animals 126

3.3. Analysis of HIS2::GFP Animals Progeny using Flow Cytometry. 126

3.3.1. Qualibration of the COPAS Biosort and Reflx Sampler..... 127

3.3.2. Analysis of the L1 and Eggs Populations using the COPAs ReFLx
Sampler 128

3.3.3. Calculation of the Embryonic Lethality 128

3.3.4. Identification and Representation of the Embryonic Lethality Profiles. 129

CHAPITRE 2

OPTIMISATION DU MARQUAGE DES ŒUFS À L'IODURE DE PROPIDIUM 131

1. MATÉRIEL ET MÉTHODES..... 131

1.1. Préparation des œufs par traitement à l'hypochlorite de sodium..... 131

1.2. Optimisation de la fixation des œufs de *C. elegans*..... 132

1.2.1. Fixation au méthanol (10 %) à -20°C..... 132

1.2.2.	Fixation au méthanol (10 %) à -80°C.....	132
1.2.3.	Fixation au méthanol (100 %) à -20°C.....	133
1.2.4.	Fixation au fixateur Ruvkun.....	133
1.2.5.	Fixation au formaldéhyde (4%).....	134
1.2.6.	Combinaison de deux fixateurs : formaldéhyde (1 ou 2 %) et méthanol (100 %) ou éthanol (70 ou 95 %).....	134
1.2.7.	Optimisation de la concentration en formaldéhyde pour la fixation des œufs.....	135
1.3.	Optimisation de la perméabilisation à la chitinase	135
1.4.	Adaptation du protocole pour le haut débit	136
2.	RÉSULTATS.....	138
2.1.	Optimisation de la fixation des œufs de <i>C. elegans</i>	138
2.2.	Optimisation de la perméabilisation	142
3.	DISCUSSION	144
3.1.	Optimisation de la concentration en IP.....	144
3.2.	Mise au point de la fixation des œufs	144
3.3.	Optimisation de la fixation de l'IP sur l'ADN.....	145
3.3.1.	Utilisation de la RNase.....	145
3.3.2.	Optimisation de la perméabilisation.....	145
3.4.	Adaptation de la méthode au haut débit	146
4.	CONCLUSIONS	146
	CONCLUSIONS.....	148
	APPENDICES.....	150
	RÉFÉRENCES.....	177

LISTE DES FIGURES

PREMIÈRE PARTIE

Figure 1.1	Structure de la famille Rho humaine.....	3
Figure 1.2	Domaines fonctionnels des GTPases de la grande famille des Ras.....	4
Figure 1.3	Modifications post-traductionnelles des protéines Rho à l'extrémité.....	6
Figure 1.4	Schémas des modifications post-traductionnelles des GTPases.....	7
Figure 1.5	Le cycle moléculaire des Rho GTPases.....	9
Figure 1.6	Hydrolyse du GTP en GDP par la Rho GTPase.....	10
Figure 1.7	Les domaines multifonctionnels des membres de la famille des Rho GAP... 11	
Figure 1.8	Les domaines structuraux des GEF chez les mammifères.....	13
Figure 1.9	Voies potentielles dans lesquelles les Rho GTPases (Cdc42, Rac et RhoA) influencent les processus tumoraux.....	19
Figure 2.1	Les Rho GAP chez le nématode <i>C. elegans</i> et leurs orthologues chez les mammifères.....	26
Figure 2.2	Implication de la famille des Rho au cours du développement embryonnaire du nématode <i>C. elegans</i>	28

DEUXIÈME PARTIE

Figure 1.1	Structure du logiciel CE modifié.....	38
Figure 1.2	Distribution des résultats de comparaison (scores Z).....	43
Figure 1.3	Détermination du seuil du prédicteur CE modifié.....	44
Figure 2.1	Intégration/Excision du bactériophage λ dans le génome d' <i>E. coli</i>	51
Figure 2.2	Technologie Gateway (Invitrogen™).....	52
Figure 2.3	Plasmide pDEST™17 (Invitrogen™).....	53
Figure 2.4	Plasmide pTrcHis (Invitrogen™).....	54
Figure 2.5	Gel d'électrophorèse SDS PAGE des Rho GTPases-GST purifiées sur billes de glutathione sépharose.....	64
Figure 2.6	Gel d'électrophorèse SDS PAGE des Rho GAP-His ₆ purifiées sur billes de Ni-Agarose.....	66
Figure 2.7	Photographies des membranes de nitrocellulose des essais de liaisons de <i>A. rga-1</i> et <i>B. rga-5</i> avec toutes les Rho GTPases de <i>C. elegans</i>	67

TROISIÈME PARTIE

Figure 1.1	Vecteur d'entrée pDONR™201 (Invitrogen™).....	72
Figure 1.2	Vecteur d'expression pL4440-DEST (Invitrogen™).....	72
Figure 1.3	Les interactions génétiques.....	83
Figure 2.1	Électrophorèse sur gels d'agarose des pL4440-Rho GAP purifiés à partir de cultures de clones de DH5 α -pL4440-Rho GAP.....	86
Figure 2.2	Photographies des gels d'agarose des inserts (Rho GAP) dans le pL4440 amplifiés par PCR.....	87
Figure 2.3	Photographies des gels d'agarose des pL4440-Rho GAP purifiés à partir de cultures de DH5 α et d'HT115 destinés au séquençage.....	89

Figure 2.4	Gels d'agarose des pL4440-Rho GAP transformés dans les HT115.....	92
Figure 2.5	Matrice des interactions génétiques entre les Rho GAP de <i>C. elegans</i> au cours du développement.....	94
Figure 2.6	Pourcentage de létalité embryonnaire des mutants des Rho GAP chez <i>C. elegans</i> après traitement à l'ARNi contrôle.....	96
Figure 2.7	Pourcentage de létalité embryonnaire des mutants pour la Rho GAP <i>rga-5</i> après traitement à l'ARNi contrôle	97
Figure 2.8	Schéma des mutations dans le gène de la Rho GAP <i>rga-5</i> , portées par les souches RB1247, RB1353 et VC992	98
Figure 2.9	Photographies du développement embryonnaire du mutant <i>rga-5(ok1498)</i> comparé au développement de la souche sauvage.....	99
Figure 2.10	Interaction tamponnante entre <i>rga-5</i> et <i>ocrl-1</i>	100
Figure 2.11	Interaction aggravante entre <i>rga-5</i> et <i>gei-1</i>	101
Figure 2.12	Interaction aggravante possible entre <i>rga-5</i> et <i>rga-2</i>	103
Figure 2.13	Interaction aggravante de type synergique entre les Rho GAP <i>rga-5</i> et <i>rga-13</i>	104
Figure 3.1	Schéma de la contraction des cellules latérales de l'hypoderme lors de l'élongation de l'embryon de <i>C. elegans</i>	106
Figure 3.2	Schéma projeté de la contraction des cellules latérales de l'hypoderme lors de l'élongation de l'embryon de <i>C. elegans</i>	110

QUATRIÈME PARTIE

Figure 1.1	Embryo staging based on fluorescent emission from animals expressing Histone::GFP translational fusion	117
Figure 1.2	Diagram of experimental procedure used to study embryonic development using RNAi and flow-cytometry.....	124
Figure 1.3	Flow-cytometry analysis of the progeny of RNAi treated-animals	129
Figure 2.1	Photographies de l'optimisation de la fixation des œufs avec différents fixateurs (méthanol, formaldéhyde et Ruvkun)	138
Figure 2.2	Étude de l'effet de la combinaison d'agents fixateurs sur la coloration au DAPI et IP des œufs	140
Figure 2.3	Photographies des œufs de <i>C. elegans</i> fixés au formaldéhyde.....	141
Figure 2.4	Optimisation de la perméabilisation de l'enveloppe des œufs de <i>C. elegans</i> avec de la chitinase	142
Figure 2.5	Photographies des œufs ayant été javellisés 24 heures auparavant leur marquage à l'iodure de propidium	143

LISTE DES TABLEAUX

DEUXIÈME PARTIE

Tableau 1.1	<i>Interactions positives et négatives répertoriées dans la littérature entre Rho GAP et Rho GTPases de mammifères.....</i>	36
Tableau 1.2	<i>Liste des interactions de Rho GAP humaines de la littérature qui ont servi à valider notre prédicteur</i>	41
Tableau 1.3	<i>Liste des interactions des Rho GAP de C. elegans ayant des homologues humains</i>	41
Tableau 2.1	<i>Protocoles d'expression optimum à utiliser pour l'expression de chaque protéine recombinante bactérienne des GAP-His₆.....</i>	57
Tableau 2.2	<i>Protocoles utilisés pour exprimer les protéines recombinantes issues des recombinants bactériens de GAP-His₆.....</i>	58

TROISIÈME PARTIE

Tableau 1.1	<i>Mutants existants pour les Rho GAP chez C. elegans.....</i>	79
Tableau 2.1	<i>Liste des 30 constructions générées pour les 22 Rho GAP de C. elegans</i>	86
Tableau 2.2	<i>Résultats du séquençage des plasmides pL4440 contenant les séquences entières ou partielles des gènes de Rho GAP du C. elegans</i>	91

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ALS	Sclérose latérale amyotrophique
ARN	Acide ribonucléique
ARNi	ARN interférent
ARNm	ARN messenger
BSA	Albumine Sérique Bovine
DAPI	4',6'-diamidino-2-phénylindole
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène-diamine-tétraacétique
FAC	Faisceaux d'actine parallèles circonférentiels
FTase	Farnésyl transférase
GAP	GTPase Activating Proteins
GDI	GDP Dissociation Inhibitors
GDP	Guanosine Diphosphate
GEF ou GEP	GTP Exchange Factors / Proteins
GGTase I	Géranylgeranyl transférase I
GTPase	Guanosine triphosphatase
GTP	Guanosine Triphosphate
HRP	Horseradish Peroxydase
IPTG	Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside
JNK	C-Jun N-terminal kinases
MEC	Matrice Extracellulaire
PBS	Phosphate Buffered Saline
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PTK	Protéine Tyrosine Kinase
RMN	Résonance Magnétique Nucléaire
RNAse	RiboNucléases
ROS	Espèces réactives de l'oxygène
SMART	Simple Modular Architecture Research Tool
TEMED	Tétraméthyléthylènediamine
Tiam	T-cell invasion and metastasis gene

RÉSUMÉ

Ce projet vise à cartographier la machinerie de régulation des Rho GTPases chez *C. elegans* afin de mieux comprendre les mécanismes d'intégration des voies de signalisation au cours du développement des organismes multicellulaires.

La première partie du projet consistait à caractériser la spécificité catalytique des Rho GAP envers les Rho GTPases *in silico* et *in vitro*. En adaptant un programme de prédiction de structures tridimensionnelles, Combinatorial Extension (CE), nous avons pu faire corrélérer une similitude structurelle avec la spécificité catalytique des GAP. Ce prédicteur amélioré a validé des interactions GAP-GTPase connues : cinq chez les mammifères et quatre avec des GAP homologues chez *C. elegans*. Les résultats de conservation des interactions que nous avons obtenus, permettent de justifier l'utilisation de ce nématode comme modèle d'étude pour l'humain. Par la suite, nous avons optimisé les essais expérimentaux pour tester la spécificité catalytique des Rho GAP de *C. elegans* en vue de valider le prédicteur.

Dans la deuxième partie nous avons étudié les interactions fonctionnelles des Rho GAP au cours du développement embryonnaire du *C. elegans in vivo*. Les résultats obtenus nous ont aidé à mieux comprendre le réseau de régulation de la GTPase *rho-1* par les GAP *rga-5*, *gei-1* et *rga-13* au cours de l'élongation embryonnaire. De plus, nous savons désormais qu'*ocrl-1* est dans une voie antagoniste à *rga-5*.

Enfin, dans la troisième partie de notre travail, nous avons mis au point une méthode d'analyse haut débit des interactions génétiques des Rho GAP sur le cytomètre en flux pour vers (le COPAS Biosort) avec des transgéniques histone::GFP. Puis cette méthode a été adaptée pour permettre d'utiliser des souches non fluorescentes, en colorant les noyaux des cellules des embryons fixés.

Ce travail a apporté un nouvel outil de prédictions et a permis de simplifier les méthodes de travail pour l'étude des machineries de régulation de GTPases Rho. La technique haut-débit que nous avons développée pourrait aussi s'adapter à l'étude d'autres régulateurs (GEF, etc).

Mots clés : *Caenorhabditis elegans*, Rho GAP, prédicteur, développement embryonnaire, haut débit

PREMIÈRE PARTIE

Introduction

CHAPITRE 1

LES GTPASES DE LA FAMILLE DES RHO

1. Signalisation cellulaire

Le développement embryonnaire des organismes multicellulaires est tributaire d'un flux continu d'informations à l'intérieur d'un réseau complexe de cellules. Les communications intercellulaire et intracellulaire sont essentielles pour qu'un organisme puisse se développer correctement. Chaque cellule doit être capable de capter les signaux émis par les autres cellules, de les intégrer, et de procéder à une réponse physiologique appropriée. Tous ces phénomènes complexes définissent la signalisation cellulaire. Des acteurs importants de cette signalisation cellulaire sont les petites protéines liant le GTP, ou GTPases.

2. Généralités

Découvertes dans le milieu des années 80, les petites GTPases appartiennent à la grande famille des Ras. Cette superfamille se décompose en 5 sous familles : les Rho, les Ras, les Ran, les Arf et les Rab. Ces GTPases sont de petits monomères d'environ 20 à 30 kDa. Elles sont capables de lier le GTP et de l'hydrolyser, ce qui respectivement les activent ou les inactivent. Suite à des changements environnementaux, le niveau d'activation de ces GTPases est régulé et contrôle la signalisation intracellulaire qui abouti à des réponses physiologiques. Chez les mammifères, la famille des Rho comporte 22 gènes qui codent pour 25 protéines. En 2007, grâce à une étude phylogénique, le groupe Boureux *et al.* a classé les Rho en 8 sous-familles, elles-mêmes réparties en 4 grands groupes : le groupe I contient les

familles *Rho* (A-C), *Rnd* (1-3) et *RhoD/RhoF* ; le groupe II, les familles *Rac/RhoG*, *Cdc42/RhoJ/RhoQ* et *RhoU/RhoV* ; le groupe III, la protéine *RhoH* et le groupe IV, les protéines *RhoBTB1* et *RhoBTB2*. Il est à noter que *RhoBTB3* ne fait pas parti de la famille *Rho* (voir Figure 1.1).

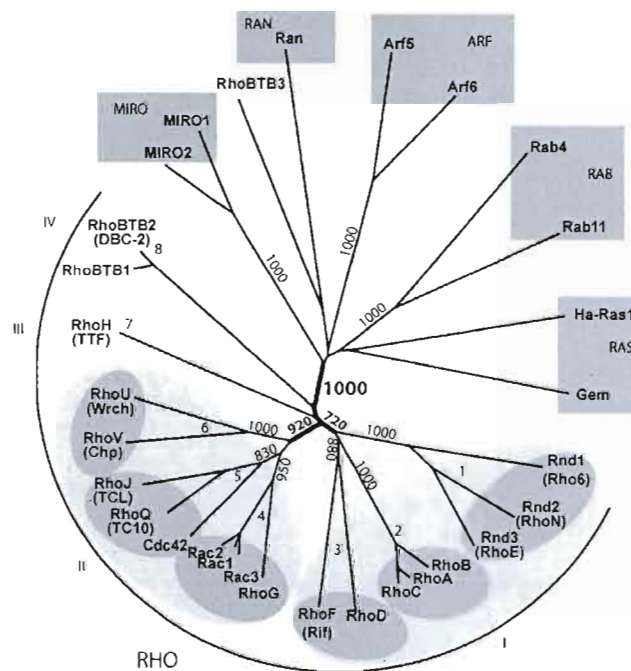


Figure 1.1 Structure de la famille Rho humaine
Les séquences des GTPases ont été alignées avec le domaine Rho correspondant aux acides aminés 5 à 173 de *Rac-1*. La famille Rho s'organise en 4 groupes de I à IV et 8 sous-familles (Tiré de Boureux *et al.*, 2007).

3. Structure

Les Rho GTPases sont essentiellement constituées d'un domaine G et d'extensions en N-terminal et en C-terminal. Ce domaine G des résidus 5 à 166, est constitué d'un ensemble d'éléments « G » débutant en N-terminal qui sont des motifs conservés liant le

GTP et le GDP: G1, GXXXXGKS/T; G2, T; G3, DXXGQ/H/T; G4, T/NKXD; et G5, C/SAK/L/T (Bourne *et al.*, 1991 ; voir Figure 1.2). Les domaines switch I (32-38) et switch II (59-67) subissent de profonds changements de conformation dépendamment si la GTPase est liée au GTP ou au GDP. La switch I joue un rôle dans la liaison de la GTPase à son effecteur (Ihara *et al.*, 1998) ainsi que le domaine spécifique de la famille des Rho, un insert de 13 acides aminés (Freeman *et al.*, 1996). La structure tridimensionnelle des Rho GTPases est formée de 6 feuillets bêta connectés entre eux par des hélices alpha (Ihara *et al.*, 1998 ; voir Figure 1.2 (b)).

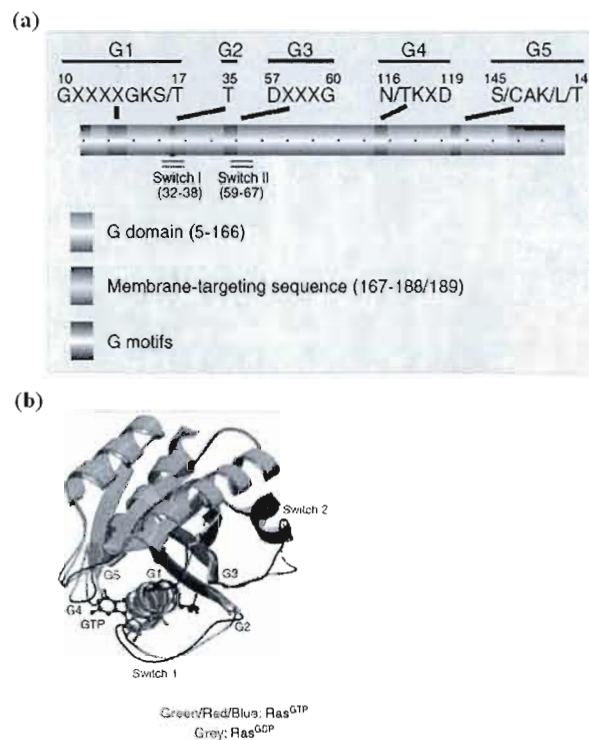


Figure 1.2 Domaines fonctionnels des GTPases de la grande famille des Ras
(a) Structure schématique des GTPases, (b) Structure cristalline du complexe GTPase-GTP.
(Tiré de Wennenberg *et al.*, 2005).

4. Expression

Les Rho GTPases sont exprimées en majorité de façon ubiquitaire. Mais le niveau d'expression de ces protéines peut varier d'un type de tissu à l'autre. Certaines ont cependant une expression spécifique d'un tissu. Par exemples : *Rac2* et *RhoH* sont spécifiques des cellules hématopoïétiques (Roberts *et al.*, 1999 ; Cherry *et al.*, 2004) ; *Rnd2* est exprimée uniquement dans les testicules et *Rnd1* est principalement localisée, chez l'adulte, dans le cerveau et le foie (Naud *et al.*, 2003 ; Nobes *et al.*, 1998).

5. Modifications post-traductionnelles

Les modifications post-traductionnelles des Rho GTPases permettent leur localisation, et conséquemment la régulation de leur fonction (Roberts *et al.*, 2008). Ces modifications consistent en des palmitoylations, des prénylations, des protéolyse et des carboxyméthylation (voir Figure 1.3 et Figure 1.4). Les protéines Rho présentent à leur extrémité COOH-terminale une boîte consensus de type CAAX (C : cystéine, A : acide aminé aliphatique et X : acide aminé quelconque). Les modifications commencent par une prénylation sur la séquence CAAX soit d'un farnésylpyrophosphate par la farnésyl transférase (FTase), soit d'un géranylgeranylpyrophosphate par la géranylgeranyl transférase (GGTase). La nature de l'acide aminé X dicte le choix de l'isoprène, on retrouve deux groupes : lorsque X est une sérine ou une méthionine la FTase ajoute un farnésyl, lorsque le X est une leucine la GGTase I fait une géranylgeranylation (Moore *et al.*, 1991). La suite des modifications post-traductionnelles est une protéolyse du tripeptide AAX en C terminale, ce qui expose la cystéine modifiée à la carboxyméthyltransférase. Pour *H-Ras* et *K-Ras* il existe des modifications supplémentaires comme la palmitoylation (Walker et Olson, 2004).

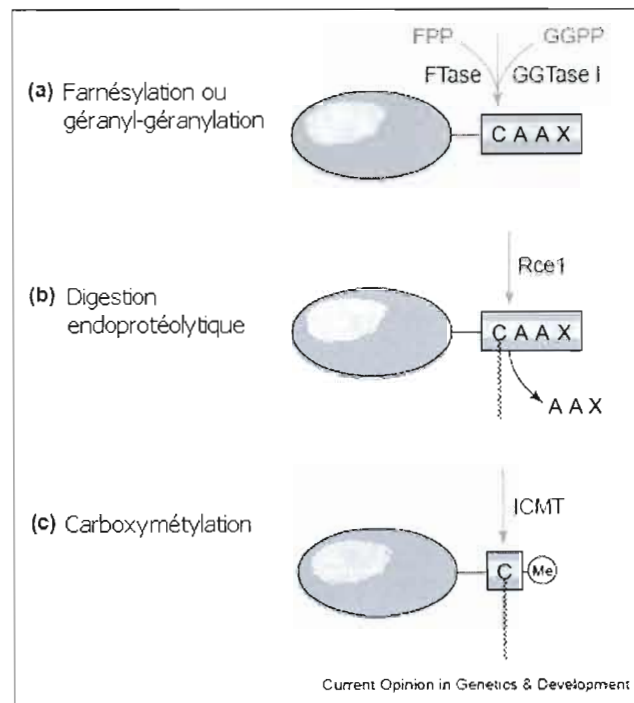


Figure 1.3 Modifications post-traductionnelles des protéines Rho à l'extrémité C-terminale

(a) Addition de 15 carbones d'un groupe farnesyl par la farnésyl transférase (FTase) avec un farnesylpyrophosphate (FPP) donneur, ou addition de 20 carbones d'un groupe géranylgeranyl par la géranylgeranyl transférase de type I (GGTase I) à l'aide d'un géranylgeranylpyrophosphate (GGPP) donneur. (b) Digestion endoprotéolytique par l'endopeptidase Rce 1 qui relargue les trois acides aminés terminaux, exposant la cystéine modifiée. (c) Méthylation du résidu cystéine modifié par une carboxyméthyltransférase (CMT). (Tiré de Walker et Olson, 2004).

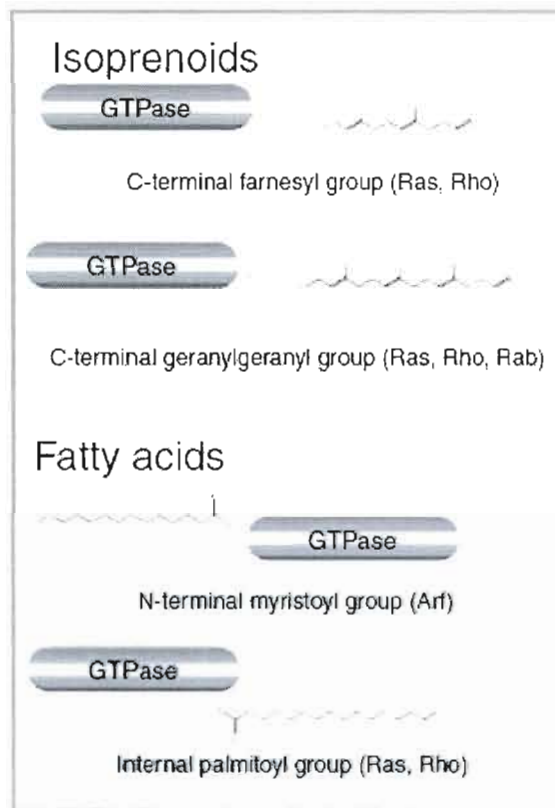


Figure 1.4 Schémas des modifications post-traductionnelles des GTPases

Il existe quatre sortes de modifications post-traductionnelles chez les GTPases de la superfamille des Ras. Deux de ces modifications sont des ajouts d'isoprénoides : les groupes farnésyl et géranylgeranyl qui s'ajoutent tous deux en C-terminal. Les deux autres sont des ajouts d'acides gras : le groupement myristoyle s'ajoute en C-terminal alors que le groupement palmitoyle s'ajoute dans la chaîne d'acides aminés (Tiré de Wennenberg *et al.*, 2005).

6. Localisation

Les petites protéines G de la famille Rho sont localisées dans le cytosol mais grâce aux modifications post-traductionnelles mentionnées plus haut, elles se localisent également dans la membrane plasmique, au niveau de l'appareil de Golgi, des endosomes précoces et tardifs, et dans le noyau. Une petite fraction de *RhoA*, *RhoB* et *RhoC* est localisée à la membrane plasmique, cependant une majorité de *RhoA* et *RhoC* est cytosolique alors que

RhoB est associée aux endosomes précoces et au compartiment pré-lysosomal (Robertson *et al.*, 1995 ; Adamson *et al.*, 1992). Il est intéressant de noter que *Rac1* et *RhoA* sont localisées de manière polarisée à la membrane plasmique, dans les cavéoles (Michaely *et al.*, 1999). *RhoA* une fois activée, se localise également à la membrane nucléaire, et *RhoB* se localise au niveau vésiculaire et périnucléaire (Baldassare *et al.*, 1997 ; Zalzman *et al.*, 1995). En 2003 Riento *et al.*, ont réussi à localiser *RhoE* dans le cytosol et dans le réseau trans-golgien. *Rac1* est essentiellement retrouvée au niveau de l'enveloppe nucléaire, de l'appareil de Golgi et du réticulum endoplasmique et il a été détecté sur la surface cytoplasmique des vésicules pinocytotiques (Robertson *et al.*, 1995).

7. Cycle d'activation et d'inactivation

Les Rho GTPases lient alternativement le GTP et le GDP leur permettant d'avoir un cycle d'activation/inactivation semblable à un interrupteur. Lorsqu'elles sont liées au GTP elles sont actives, et cela entraîne un changement conformationnel permettant une interaction avec un effecteur de la GTPase. Lorsqu'il y a hydrolyse du GTP en GDP alors la GTPase redevient inactive. Ces changements d'activité sont contrôlés par des régulateurs (voir Figure 1.5).

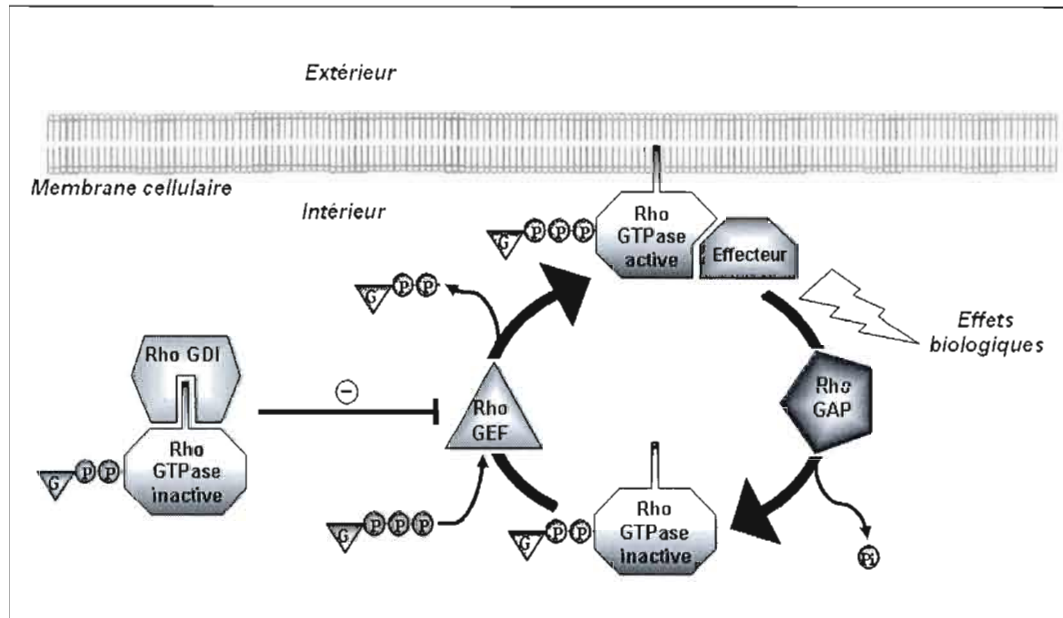


Figure 1.5 Le cycle moléculaire des Rho GTPases

7.1. Régulateurs

Le cycle d'activation des GTPases est étroitement contrôlé par trois types de régulateurs : les GEF ou GEP (GTP Exchange Factors or Proteins), les GAP (GTPase Activating Proteins) et les GDI (GDP Dissociation Inhibitors). De plus, elles possèdent une activité GTPasique intrinsèque qui consiste à hydrolyser le phosphate en position gamma sur le GTP pour donner du GDP et du phosphate inorganique (Pi) (voir Figure 1.6). Mais cette réaction est lente et nécessite un catalyseur : la GAP. Cette dernière désactive ces interrupteurs moléculaires en activant l'activité GTPasique intrinsèque. À l'inverse des GAP, les GEF ou GEP activent les Rho GTPases en favorisant l'échange du GDP contre du GTP. Lors de l'activation, la GTPase change de conformation et permet à des effecteurs de se lier à elle. Ceci aura pour conséquence une cascade d'activation et de désactivation de différentes protéines menant à des effets biologiques tels que la prolifération, la migration, la modification du trafic membranaire, et le suicide cellulaire. Le troisième régulateur, la GDI d'une part séquestre la GTPase dans le cytoplasme et d'autre part, inhibe la dissociation du

complexe GTPase-GDP par l'intermédiaire de la GEF. Nous ne savons pas par quel mécanisme la GTPase se dégage de la GDI. Néanmoins, la littérature scientifique nous apprend qu'une fois libérée de sa séquestration, la Rho GTPase va pouvoir s'ancrer dans le feuillet interne de la membrane cellulaire par son extrémité C-terminale qui a subi une modification lipidique. Le complexe GDI/GTPase représente un réservoir de GTPases dans le cytoplasme cellulaire (voir Figure 1.5 ; Jenna et Lamarche-Vane, 2004).

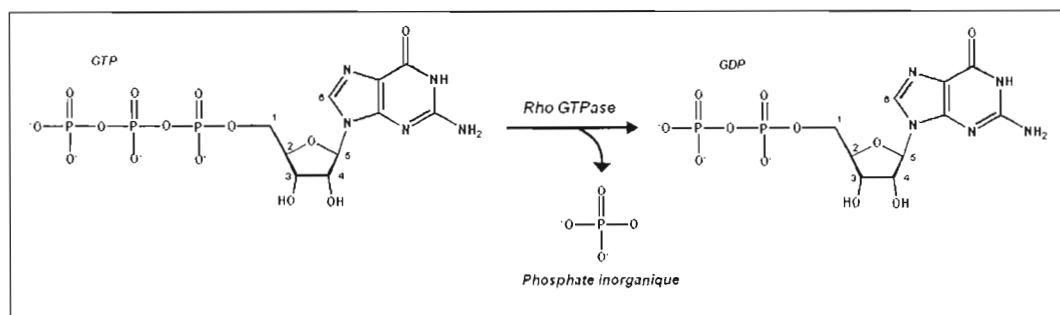


Figure 1.6 Hydrolyse du GTP en GDP par la Rho GTPase

7.1.1. GTPase activating proteins (GAP)

Les Rho GAP ont été classées par homologie de leur domaine Rho GAP ou domaine BH (BCR-Homology) (Diekmann *et al.*, 1991). Il en existe actuellement 70 chez les humains pour seulement une vingtaine de Rho GTPases, ce qui suggère que ces protéines sont fonctionnellement redondantes. De plus ce sont des protéines multimodulaires (voir Figure 1.7) ce qui contribuerait à la spécialisation fonctionnelle des Rho GAP. Le rôle des Rho GAP est de catalyser l'hydrolyse du GTP en GDP par la GTPase. Le domaine Rho GAP interagit avec le domaine de liaison du GTP et avec les régions Switch I et Switch II de la GTPase Rho. Les GAP introduisent un résidu arginine du domaine GAP dans le site actif de la GTPase, au contact du résidu glutamine dans la switch II, ce qui vient stabiliser les charges négatives durant l'état de transition de l'hydrolyse du GTP. De plus ce doigt d'arginine de la GAP vient positionner le résidu glutamine de la GTPase ce qui coordonne l'attaque

nucléophile par une molécule d'eau (Fidyk et Cerione, 2002). D'après les études phylogéniques, les caractéristiques fonctionnelles des Rho GAP envers leurs Rho GTPases ne se trouve que partiellement dans la similarité de la séquence primaire des protéines. Elles se trouveraient plutôt dans la structure tridimensionnelle du domaine GAP (Jenna et Lamarche-Vane, 2004).

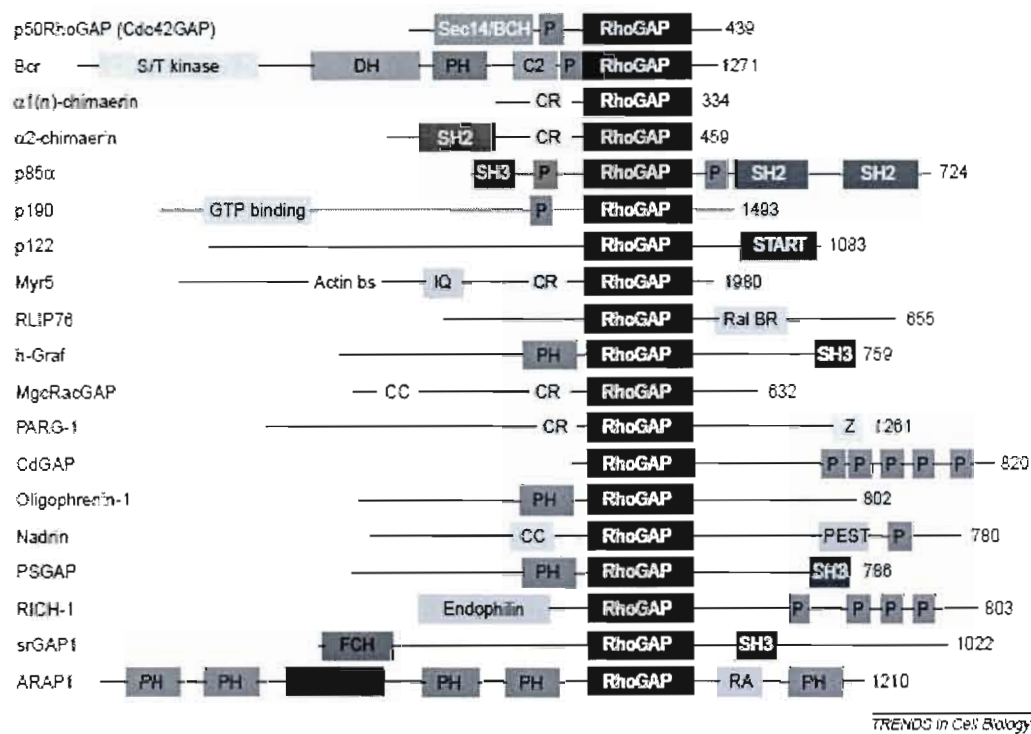


Figure 1.7 Les domaines multifonctionnels des membres de la famille des Rho GAP
 Abréviations: Actin bs, actin filament binding site; C2, calcium-dependent lipid binding; CC, coiled coil; CR, cysteine rich, zinc butterfly motif, binds diacylglycerol and phorbol ester; DH, Dbl homology; Endophilin, Endophilin homology domain; FCH, Fes/CIP4 homology domain; IQ, calmodulin binding; PH, pleckstrin homology; P, proline-rich SH3 binding motif; PEST, amino acids P-, E-, S- and T-rich degradation motif; RA, Ras-associating domain; Ral BR, Ral GTPase binding region; RhoGAP, Rho GTPase-activating protein motif; Sec14/BCH, Sec14 homology/BNIP2 and Cdc42 GAP homology; SH2, Src homology 2; SH3, Src homology 3; S/T kinase, serine and threonine kinase; START; Star-related lipid transport domain; Z, PDZ binding region (d'après Moon et Zheng, 2003).

7.1.2. Guanine nucleotide exchange factors (GEF)

La première GEF a été isolée en 1985 par Eva et Aaronson ; puis il a été démontré qu'elle était capable de catalyser l'échange de nucléotide sur *Cdc42* humaine *in vitro* (Hart *et al.*, 1991). Quelques années plus tard le domaine DH (Dbl homology), a été démontré comme étant nécessaire pour l'activité GEF (Hart *et al.*, 1994). Aujourd'hui, 69 membres de la famille Dbl sont connus (Schmidt et Hall, 2002). En 2005, le groupe de Zhang a démontré que les GEF ont un mécanisme d'action par lequel l'échange de nucléotide se produit sur la GTPase selon un déplacement GTP/GDP. L'interaction entre le domaine DH de la GEF et les domaines switch I et switch II de la GTPase chargée en GDP, déstabilise le complexe GDP/GTPase tout en stabilisant l'intermédiaire réactionnel sans nucléotide (Cherfils et Chardin., 1999). Du fait du haut ratio intracellulaire GTP/GDP, le GDP relargué est rapidement remplacé par une molécule de GTP. Deux autres familles de GEF sans domaine DH, ont été identifiées : la famille *DOCK* contenant un domaine DHR-2 (Dock Homology Region-2) et la famille *SWAP* (Coté et Vuori, 2002 ; Shinohara *et al.*, 2002). Quelques GEF sont spécifiques pour une seule GTPase (*p115RhoGEF/Rho*) alors que d'autres peuvent en activer plusieurs (*Dbl/Rho*, *Cdc42*) (Hart *et al.*, 1996; Hart *et al.*, 1994). Il semble qu'il n'est pas possible de prédire la spécificité d'une GEF pour une GTPase par regroupement phylogénétique (Schmidt et Hall, 2002). Les GEF, tout comme les GAP sont multimodulaires (voir Figure 1.8) et leur activité semble être régulée par divers mécanismes incluant des interactions protéine-protéine, la phosphorylation ou leur localisation subcellulaire.

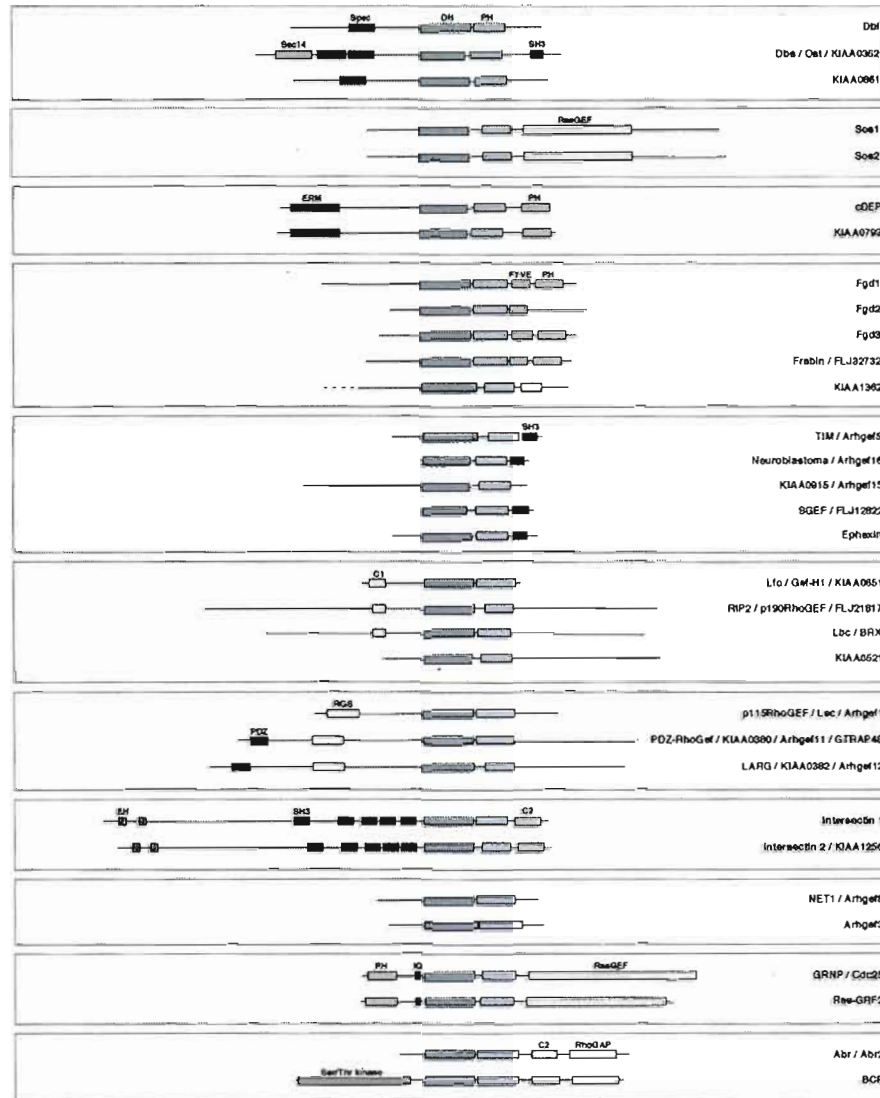


Figure 1.8 Les domaines structuraux des GEF chez les mammifères

Les domaines montrés sont DH (Dbl homology domain), PH (pleckstrin homology domain), Spec (spectrin repeats), Sec14 (domain in phosphatidylinositol transfer protein Sec14), SH3 (src homology 3 domain), ERM (ezrin/radixin/moesin domain), FYVE (domain present in Fab1, YOTB, Vac1, and EEA1), C1 (Protein kinase C conserved region 1), RGS (regulator of G protein signaling domain), PDZ (domain present in PSD-95, Dlg, and ZO-1/2), EH (Eps15 homology domain), C2 (Protein kinase C conserved region 2), IQ (calmodulin-binding motif), TM (transmembrane domain), IGc2 (immunoglobulin C-2 type domain), FN3 (Fibronectin type 3 domain), IG (immunoglobulin domain), MORN (plasma membrane-binding motif in junctophilins, PIP-5-kinases, and protein kinases), VPS9 (domain present in vacuolar sorting protein 9), CH (Calponin homology domain), AC (acidic region), SH2 (Src homology 2 domain), BRCT (breast cancer C-terminal domain), RBD (Ras-binding domain), DEP (domain found in Dishevelled, Egl-10, and pleckstrin). Tiré de Schmidt et Hall 2002.

7.1.3. GDP dissociation inhibitors (GDI)

Seules trois GDI ont été décrites jusqu'à présent. La première, Rho *GDI-1*, fut isolée en 1989 (Ohga *et al.*, 1989). La seconde, Rho *GDI-2*, tout d'abord appelée *D4/Ly-GDI*, est exprimée dans les tissus hématopoïétiques (Lelias *et al.*, 1993 ; Scherle *et al.*, 1993). Enfin la troisième, Rho *GDI-3* a été isolée en 1996 par Zalzman et ses collègues. La structure des Rho GDI se caractérise par l'existence d'un domaine C-terminal structuré de type immunoglobuline, qui est nécessaire pour l'interaction avec la GTPase au niveau de la switch II. La structure de ce domaine est très flexible ce qui lui permet de former une poche hydrophobe dans laquelle s'incère le lipide isoprénique de la GTPase (Keep *et al.*, 1997). Le deuxième domaine fonctionnel se trouve en N-terminal, il se lie à la switch I et II de la GTPase et est responsable de l'inhibition de la dissociation du GDP et de l'hydrolyse du GTP. Les Rho GDI sont capables d'extraire des membranes la Rho GTPase liée au GDP en se liant à son extrémité C-terminale, masquant ainsi le lipide isoprénique hydrophobe, et en maintenant la GTPase inactive sous une forme soluble dans le cytosol (Nomanbhoy *et al.*, 1999 ; Hoffman *et al.*, 2000) et de la livrer à une membrane cible. Il a été montré récemment que la régulation des Rho GDI était importante pour leur contrôle de l'activité des Rho GTPases. Par exemple, la phosphorylation de Rho GDI par la *PKC* ou *pak-1* diminue fortement l'affinité de Rho GDI pour *Rac-1* (Bustelo *et al.*, 2007).

8. Les fonctions des Rho GTPases

Le rôle des Rho GTPases couvre beaucoup d'aspects de la régulation cellulaire incluant la régulation du cytosquelette d'actine, la morphologie, la phagocytose, la migration, le trafic vésiculaire, la transcription génique, la progression du cycle cellulaire, la cytokinèse, et la régulation d'un éventail de fonctions enzymatiques.

8.1. Cytosquelette d'actine

Des études ont montré que *Rho* est essentiel pour l'assemblage coordonné des adhésions focales et des fibres du stress (Ridley et Hall, 1992). De plus, *Rac* et *Rho* sont les acteurs prédominants de la signalisation pour l'organisation de l'actine polymérisée (Ridley et Hall, 1992). *Cdc42* déclenche la formation de filopodes et *Rac*, celle de lamellipodes et des replis membranaires. *Rac* et *Cdc42* stimulent tous deux l'assemblage de complexes multimoléculaires focaux à la membrane plasmique (Nobes et Hall, 1995). *RhoA*, activée par l'acide lysophosphatidique entraîne la formation de fibres du stress responsable de la forme de la cellule et la formation de points focaux d'adhésion responsables de l'ancrage de la cellule à la matrice extracellulaire (Ridley et Hall, 1992). À l'inverse, *Rnd1* et *RhoE/Rnd3* inhibent la formation de fibres de stress d'actine et des points focaux d'adhésion induits par *RhoA* (Nobes *et al.*, 1998 ; Guasch *et al.*, 1998). *RhoA* participe à la migration cellulaire en déstabilisant des points d'adhésion à la matrice et la contraction de l'arrière de la cellule alors que *Rac1* jouerait le rôle moteur de polymérisation de l'actine à l'avant des cellules (Worthylake *et al.*, 2001). *Cdc42* est principalement impliqué dans l'établissement de la polarité (Etienne-Manneville et Hall, 2001).

8.2. Trafic membranaire

Les GTPases Rho sont impliquées dans le trafic membranaire. Pour les mécanismes d'endocytose indépendants des clathrines, qui sont des voies d'endocytose dépendantes des phénomènes de polymérisation de l'actine ; *Rac1* et *Cdc42* semblent essentielles à la phagocytose de type 1 alors que *RhoA* semble participer spécifiquement à la phagocytose de type 2 (Caron et Hall, 1998). Pour l'endocytose dépendante des clathrines, *RhoA* et *Rac1* y participeraient via leur activité sur la production de *PIP2*, conduisant à la fusion des vésicules de clathrine avec les endosomes précoces et *RhoA* inhiberait l'internalisation des récepteurs en les séquestrant au niveau des cavéoles (Lamaze *et al.*, 1996). *Cdc42* interviendrait au moment de la formation des vésicules de clathrine (Hussain *et al.*, 2001). *RhoD* est impliquée dans le mouvement des endosomes précoces via la polymérisation de l'actine et la

réorganisation des microtubules (Gasman *et al.*, 2003). *TC10* participe dans les adipocytes à la régulation du transfert dépendant de l'insuline de *GLUT4* (transporteur de glucose) des vésicules de stockage vers la membrane plasmique (Chiang *et al.*, 2001).

8.3. Transcription, prolifération et survie cellulaire

De nombreuses études ont montré l'importance des GTPases Rho dans le contrôle de l'expression génique puisqu'elles sont impliquées dans la régulation de nombreux facteurs de transcription. Par exemple, *SRF* est régulé par *RhoA*, *Cdc42* et *Rac1* (Hill *et al.* 1995), *Rac* régule *NFkB* et *JNK* (C-Jun N-terminal Kinases) (Tapon *et al.*, 1998), *Rac1* et *Cdc42* régulent *c-Jun* (Teramoto *et al.*, 1996). *Rac* et *Cdc42* constitutivement actives sont capables d'activer les voies *JNK* et *p38* (Minden *et al.*, 1995). D'autres travaux ont mis en évidence le rôle de *Rho*, *Rac* et *Cdc-42* dans le contrôle de la progression du cycle cellulaire (Olson *et al.*, 1995). Les GTPases Rho sont aussi impliquées dans le contrôle de la survie cellulaire. *RhoA*, *RhoC* et *Rac* sont capables d'induire l'apoptose dans différents types cellulaires via un mécanisme indépendant de *p53* (Esteve *et al.*, 1998). Enfin, les GTPases Rho peuvent également conduire à l'activation de signaux de survie. Par exemple, *Rac* peut activer des voies de survie dans des cellules transformées par l'oncogène *ras*, les protégeant ainsi de l'apoptose (Joneson et Bar-Sagi, 1999).

8.4. Stress et hypoxie

En cas de manque d'oxygène, il a été démontré qu'il existe une augmentation du niveau d'ARNm et des activités intracellulaires de *Rac1* et *Cdc42* en fonction du temps. De plus l'activation par *PI3K* et *PTK* de *Rac1* et *Cdc42* implique la production de facteurs pro-angiogéniques et de suppresseurs de tumeurs, ce qui suggère que *Rac1* et *Cdc42* pourraient contribuer à l'angiogenèse en conditions hypoxique (Xue *et al.*, 2006). Durant des conditions hypoxiques, il a été démontré que les espèces réactives de l'oxygène (ROS) augmentent

l'expression des protéines *RhoA*, *Cdc42* et *Rac1* et *RhoA* activée est requise pour l'accumulation de *HIF-1 α* (Turcotte *et al.*, 2003). *Rac* pouvait induire l'activation transcriptionnelle du *VEGF*, en hypoxie, par la stabilisation et l'expression de la sous-unité *HIF-1 α* (Lee *et al.*, 2006).

9. Pathologies humaines et Rho GTPases

Au cours des quinze dernières années, il a été démontré qu'un nombre toujours croissant de pathologies humaines sont associées à l'altération des GTPases ou de leurs régulateurs.

9.1. Cancers

La signalisation des Rho semble affecter beaucoup d'aspects de la cancérogenèse, puisqu'elle est impliquée, comme nous l'avons vu, dans les phénomènes migratoires, la progression du cycle cellulaire, la survie cellulaire et l'angiogenèse. Ces processus sont souvent mis en jeu lors de la transformation cellulaire (voir Figure 1.9). Pour ce qui est de la migration cellulaire, *Rac* participe à l'altération des jonctions cellulaires et favorise la dégradation de la MEC¹ en augmentant l'activité et l'expression des métalloprotéinases (Quinlan, 1999 ; Engers *et al.*, 2001 ; Zhuge et Xu, 2001). La vascularisation des tumeurs est induite par *RhoC* qui régule la sécrétion de facteurs angiogéniques. De plus, cette même GTPase semble influencer le potentiel métastatique de mélanomes *in vivo*. Enfin, une diminution du nombre des métastases a été observé dans des tumeurs chez des souris n'exprimant plus *RhoC* (van Golen *et al.*, 2000 ; Clark *et al.*, 2000 ; Hakem *et al.*, 2005). Néanmoins, certaines GTPases Rho comme *RhoB* et *RhoE* semblent avoir un rôle antagoniste sur la transformation cellulaire (Chen *et al.*, 2000 ; Bektic *et al.*, 2005). Des dominants négatifs de *Cdc42* et *RhoB* sont capables d'inhiber la transformation de fibroblastes induite

¹ Matrice ExtraCellulaire : Ensemble des composants matriciels dans l'espace extracellulaire.

par Ras (Qiu *et al.*, 1997 ; Prendergast *et al.*, 1995). À l'inverse, des mutants constitutivement actifs de *RhoA* et *Rac1* sont capables d'induire ou de potentialiser la transformation cellulaire (via Ras) (Khosravi-Far *et al.*, 1995). La seule mutation positive mise en évidence dans une tumeur humaine est celle de la GTPase *RhoH* qui cause un lymphome non-Hodgkin et de multiples myélomes (Preudhomme *et al.*, 2000). Par ailleurs, plusieurs GTPases Rho ont été retrouvées surexprimées ou suractivées dans différents types de tumeurs. En effet, l'augmentation de la quantité de *RhoA* apparaît fréquemment dans différents types de tumeurs humaines (cancer du sein en particulier) (Fritz *et al.*, 1999). Il en est de même pour *Rac3*, *Rac1b*, *RhoC*, *Rac* et *Cdc42* (Mira *et al.*, 2000 ; Schnelzer *et al.*, 2000 ; Suwa *et al.*, 1998 ; Kamaï *et al.*, 2004). D'autre part, l'altération de l'activité des régulateurs de certaines GTPases pourrait contribuer à la tumorigenèse. Les Rho GAP *DLC-1*, *tuberin* et *PARG1* sont impliquées respectivement dans le carcinome hépatocellulaire, la sclérose tubéreuse et le lymphome à cellules malignes (Grise *et al.*, 2009 ; Maheshwar *et al.*, 1997 ; Ripperger *et al.*, 2007). La Rho GEF *Vav1* est impliquée dans les adénocarcinomes pancréatiques et l'altération de *Tiam-1* affecte la progression des cancers du sein (Fernandez-Zapico *et al.*, 2005 ; Strumane *et al.*, 2009).

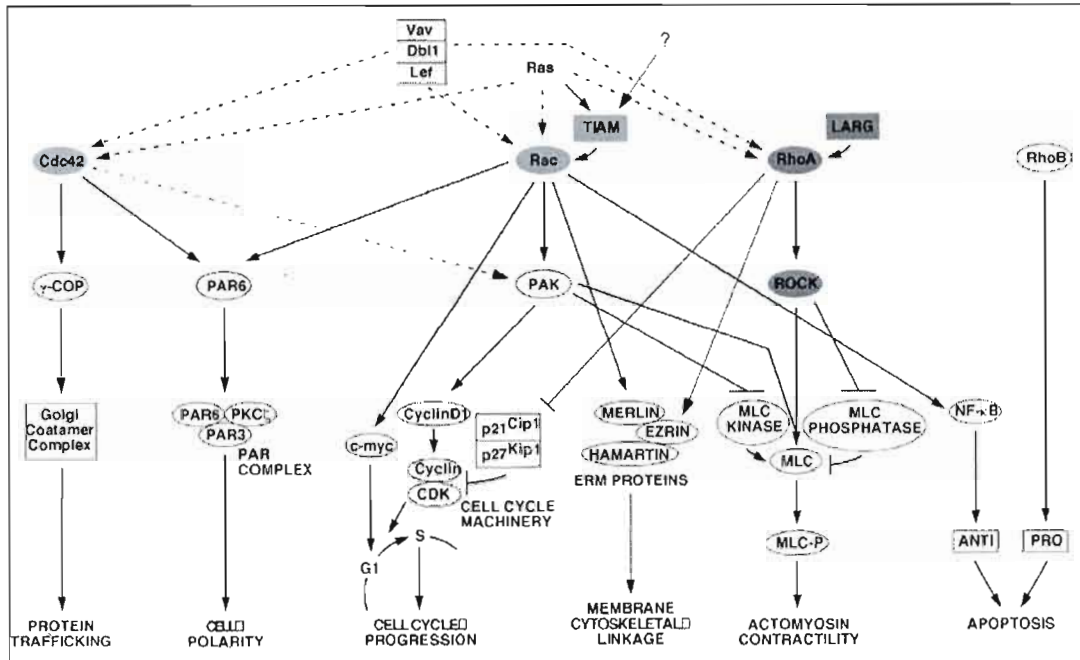


Figure 1.9 Voies potentielles dans lesquelles les Rho GTPases (*Cdc42*, *Rac* et *RhoA*) influencent les processus tumoraux

La signalisation de la grande famille des Ras affecte de nombreux aspects de la cancérogénèse. *Cdc42* est impliquée dans le trafic protéique et la polarité cellulaire. *Rac* est impliquée dans la progression du cycle cellulaire, les phénomènes migratoires et la survie cellulaire. *RhoA* est impliquée dans les phénomènes migratoires et la progression du cycle cellulaire. Ces processus sont souvent mis en jeu lors de la transformation cellulaire (d'après Boettner et Van Aelst, 2002).

9.2. Retard mental

Les Rho sont également impliquées dans les voies de signalisation régulant les processus neuronaux. Le développement neuronal se divise en 5 étapes : les neurones commencent par former des lamellipodes (étape 1) puis étendent quelques croissances (étape 2) dans les 24 heures l'un d'eux va former l'axone (étape 3) et les autres des dendrites (étape 4) qui vont faire des branchements dendritiques et former des prolongements (étape 5). *RhoA* est impliquée dans la rétraction des neurites alors que *Rac1* (avec *Tiam-1*) et *Cdc42* ont un rôle dans la croissance des neurites (Jalink *et al.*, 1994 ; Ehler *et al.*, 1997 ; Chen *et al.*, 1999).

L'activation des récepteurs *Notch* permet la modulation de l'activité des Rho GTPases *RhoA*, *Cdc42* et *Rac1* dans le développement des dendrites (Threadgill *et al.*, 1997). La formation de l'axone et la polarisation des neurones est contrôlée par *Rac1-Tiam1* (Kunda *et al.*, 2001). Enfin, *RhoA* et *Rac1* jouent des rôles distincts dans les branchements dendritiques (Nakayama *et al.*, 2000).

L'importance des Rho GTPases dans les processus neuronaux, explique aisément leur implication dans des maladies génétiques liées à un retard mental. Le retard mental est associé à une morphologie immature des synapses qui sont les structures responsables de la neurotransmission ; ce qui a pour conséquence un déficit de la mémoire et de l'apprentissage.

La famille des Rho a montré son implication directe dans un grand nombre de maladies génétiques liées à l'X entraînant un retard mental (MRX) (Ramakers, 2000). Le syndrome de Lowe ou oculocérébro-rénal est causé par l'altération de la RhoGAP *OCRL-1*. Ce syndrome est lié à l'X et cause un retard mental, des cataractes congénitales, et un déficit des tubules rénaux (Leahey *et al.*, 1993 ; Faucherre *et al.*, 2003). *Oligophrenine-1* est une GAP pour *RhoA*, *Cdc42* et *Rac1*. Si une mutation entraîne sa perte de fonction, il en résulte un retard mental (Billuart *et al.*, 1998). Le syndrome de William est causé par l'altération de *LIM-kinase 1*, qui participe dans la réorganisation du cytosquelette d'actine contrôlé par *Rac1* (Yang *et al.*, 1998). Une mutation ponctuelle de *PAK-3* (A365E), un effecteur de *Cdc42* et de *Rac*, la rend non-fonctionnelle et cause un retard mental (Gedeon *et al.*, 2003). Le syndrome de la microphthalmie avec une défectuosité de la peau (microphthalmia with linear skin defects) est une maladie, causant entre autre un retard mental, résultant d'une délétion du bras court du chromosome X. la RhoGAP *ARHGAP6* pourrait être impliquée dans cette maladie (Schaefer *et al.*, 1997). Une mutation dans l'exon 2 de la Rho GEF *ARHGEF6* cause également un retard mental (Kutsche *et al.*, 2000). La plus fréquente cause de retard mental héréditaire (le syndrome de l'X fragile) est due à l'absence de la protéine du retard mental de l'X fragile (FMRP). La *FMRP* semble interagir avec *CYFIP1/2* qui est un partenaire de *Rac1* qui est impliquée dans le développement et le maintien des structures neuronales (Schenck *et al.*, 2001). La sclérose latérale amyotrophique (ALS) est une maladie neuro-dégénérative qui affecte les motoneurons du système nerveux central. Il a été démontré que le gène codant pour la protéine *alsine*, une Rho GEF, est mutée dans une forme récessive de l'ALS (Yang *et al.*, 2001).

9.3. Autres désordres

Les Rho GTPases sont aussi impliquées dans d'autres maladies génétiques. La maladie de Tangier est un désordre rare lié aux lipoprotéines et est associé à une diminution de l'efflux du cholestérol. *Cdc42* serait sous-exprimée dans cette maladie et aurait un rôle à jouer dans l'efflux du cholestérol (Hirano *et al.*, 2000). En 1994, la caractérisation du gène du syndrome d'Aarskog-Scott (*FGD1*), une maladie causant une dysplasie facio-génitale a montré que c'est une GEF pour *RhoA* et *Rac1* qui est en cause (Pasteris *et al.*, 1994). Le syndrome Wiskott-Aldrich et la thrombocytose liée à l'X sont tous deux causés par l'altération de *WASP*, un effecteur pour *Cdc42* (Derry *et al.*, 1995 ; Symons *et al.*, 1996). Enfin, la surdité progressive non-syndromique, une maladie génétique autosomale dominante est causée par la troncation de la protéine *DFNA1* qui est un effecteur de *RhoA* (Lynch *et al.*, 1997 ; Watanabe *et al.*, 1997).

9.4. Infections bactériennes

Finalement, les Rho sont impliquées dans les infections bactériennes, puisqu'elles sont la cible de trois types de toxines bactériennes. La première classe de toxines rend les Rho GTPases constitutivement inactives et empêche la signalisation en aval de la GTPase. Dans cette classe se trouve la Rho GTPase-inactivating C3 exotoxine qui est une ADP-ribosyltransférase et la LCC (large clostridial toxin) qui est une glycosyltransférase. La C3 transférase provenant de *Clostridium botulinum* ajoute de façon covalente des résidus ADP-ribosyles aux GTPases *Rho A*, *B* et *C* afin de les empêcher d'interagir avec leur GEF, ainsi la GTPase ne peut s'activer (Rubin *et al.*, 1988 ; Chardin *et al.*, 1989). La glycosylation de *Rho*, *Rac* et *Cdc42* sur un résidu thréonine (Thr) par la toxine LCC (*Clostridium spp.*) interfère dans la liaison du GTP. Ceci a pour conséquence d'inhiber l'association des effecteurs, ce qui empêche la cascade d'activation des voies de signalisation en aval de la GTPase (Just *et al.*, 1995). La deuxième classe de toxines rend les GTPase constitutivement actives. Dans cette classe se trouve la Rho GTPase déaminase *CNF* (cytotoxic necrotizing factor) d'*Escherichia Coli* qui désamine le résidu glutamine (Gln) essentiel à l'hydrolyse du GTP, ainsi la GTPases reste active (Sugai *et al.*, 1999). La *DNT* (dermonecrotic toxin) de *Bordetella spp.* est une

transglutaminase qui active constitutivement *Cdc42* et *Rac1* en ajoutant une amine sur le résidu Gln 63 (Masuda *et al.*, 2002). La dernière et troisième classe de toxines est la classe des toxines injectées directement dans la cellule hôte. Ces toxines miment les Rho GAP de *Cdc42*, *Rac1* et *RhoA* ce qui entraîne une désorganisation du cytosquelette et assure l'entrée de la bactérie dans la cellule hôte (Black et Bliska, 2000).

Vu leur implication dans un très grand nombre de processus biologiques, et par conséquent dans de nombreuses maladies humaines, les Rho GTPases jouent un rôle essentiel. D'où le grand intérêt d'étudier ces GTPases de la famille des Rho.

CHAPITRE 2

UN MODÈLE ANIMAL, *CAENORHABDITIS ELEGANS*

1. Le nématode *Caenorhabditis elegans*

En 1965, *Caenorhabditis elegans* est devenu un modèle de choix pour l'étude du développement et du comportement, grâce à Sydney Brenner (Brenner, 1974). Cet animal offre de nombreux avantages pour son étude en laboratoire. En effet son cycle de vie est rapide (trois jours à 25°C) alors qu'un seul individu hermaphrodite est capable de donner une progéniture d'environ 300 individus. *C. elegans* est doté de la complexité d'un organisme multicellulaire, tout en étant relativement simple en termes de taille (1,5 mm de long) et de nombre de cellules (moins de 1000). Cet organisme a été largement étudié et les chercheurs bénéficient aujourd'hui des librairies quasi complètes de son ORFeome et d'ARNi de son génome, ainsi que de nombreux mutants (Reboul *et al.*, 2001 et 2003 ; Kamath *et al.*, 2003 ; Kim *et al.*, 2005 ; Rual *et al.*, 2004 ; Dupuy *et al.*, 2004).

2. Le développement embryonnaire chez *C. elegans*

2.1. Les étapes du développement

Le développement embryonnaire de *C. elegans* dure seulement 14 heures à 20°C. Le point d'entrée du spermatozoïde dans l'ovule détermine le pôle postérieur de la cellule œuf (Goldstein et Hird, 1996). En effet, la fertilisation induit l'association d'un groupe de protéines appelées *PAR*. *PAR-2* et *PAR-1* s'associent avec le pôle postérieur de la cellule, alors que *PAR-3* et *PAR-6* s'associent avec le pôle antérieur (Boyd *et al.*, 1996; Etemad-Moghadam *et al.*, 1995; Guo et Kemphues, 1995 ; Hung et Kemphues, 1999). La localisation

de ces protéines *PAR* est crucial pour l'établissement de la polarité de l'embryon (Munro *et al.*, 2004).

Les premières segmentations ont lieu de manière asymétriques. La première division forme une cellule postérieure P et une cellule antérieure AB. La cellule P va se comporter en cellule souche en maintenant une cellule P (de P1 à P4) et en formant successivement les blastomères EMS, C et D. La cellule P4 résiduelle va se diviser une dernière fois au cours de la vie embryonnaire puis va devenir le précurseur des cellules germinales. AB va se diviser en ABa et ABp, et ces dernières vont se diviser pour former ABal et ABar d'une part et ABpl et ABpr d'autre part (Sulston *et al.*, 1983).

Ces premières divisions asymétriques permettent de former les 3 axes principaux de l'embryon. À l'étape d'une cellule, le centrosome du spermatozoïde détermine l'axe antéro-postérieur (AP). Lors de la transition de deux et quatre cellules se forme l'axe dorso-ventral (DV) avec le blastomère EMS qui devient la partie ventrale de l'embryon (Schnabel et Priess, 1997). Enfin de quatre à six cellules, la localisation à gauche des cellules ABal et ABpl définit l'axe gauche-droite (GD).

L'embryon doit également établir une polarité intérieur-extérieur. Pour cela, à 26 cellules, l'embryon de *C. elegans* commence sa gastrulation. Les cellules de la surface ventrale vont devenir les précurseurs du mésoderme et de l'endoderme grâce à différents signaux cellulaires et à la localisation asymétrique de différents facteurs. (Bowerman *et al.*, 1993; Bowerman *et al.*, 1992; Lin *et al.*, 1995; Rocheleau *et al.*, 1997). Les cellules précurseurs de l'endoderme, les deux cellules filles du blastomère E vont initier la gastrulation en migrant de l'extérieur vers l'intérieur. Peu de temps après les précurseurs de l'endoderme, les descendants de MS, et le précurseur des cellules souches, P4, vont à leur tour s'invaginer dans l'embryon. Ces événements font parti de la formation du blastocœle. Ces précurseurs de l'endoderme et du mésoderme vont par la suite former l'intestin et le système musculaire (Nance et Priess, 2002 ; Goldstein, 1992; Sulston *et al.*, 1983).

À environ 300 cellules se forme les canaux excrétoires. La cellule excrétoire commence sa morphogenèse à partir de l'épiderme ventral de la tête en étendant des canaux bipolaires dorsalement à l'épiderme latéral. En atteignant l'épiderme latéral, ces canaux bifurquent et croissent vers l'avant et l'arrière sur presque toute la longueur de l'animal (Nelson *et al.*, 1983 ; Hedgecock *et al.*, 1987).

300 minutes après la première division, les cellules de l'hypoderme (l'épithélium externe) vont venir entourer l'embryon en deux étapes en se rejoignant ventralement. Tout d'abord, les deux paires de cellules hypodermales antérieures controlatérales de la rangée ventrale migrent sur des neuroblastes vers le milieu de la ligne ventrale en allongeant des filopodes jusqu'à ce qu'elles se rencontrent pour former des jonctions cellulaires. Puis, huit paires de cellules hypodermales du postérieur controlatéral sont tirées ensemble par la force des contractions d'actine et forment des jonctions cellulaires (Priess et Hirsh, 1986; Raich *et al.*, 1999; Simske et Hardin, 2001; Williams-Masson *et al.*, 1997 ; Sawa *et al.*, 2003). À 400 minutes, l'embryon tourne à 90° et commence son élongation le long de l'axe antéro-postérieur. Les cellules hypodermales qui entourent l'embryon contiennent des bagues d'actine qui se contractent pour resserrer l'embryon de façon à augmenter sa longueur et à former un vers cylindrique. L'embryon se plie en 2 puis en 3 (Priess et Hirsh, 1986 ; Wissmann *et al.*, 1999). En même temps que l'élongation a lieu, l'organogenèse de l'intestin et du pharynx se produit (Leung *et al.*, 1999 ; Portereiko et Mango, 2001). La fin de l'élongation (au-delà du stade 2 plis) se caractérise par la différenciation des muscles aux environ de 430 minutes, ceci est visible par la contraction de l'embryon (Williams et Waterston, 1994). La larve L1 sort de la coquille 800 minutes après la première division.

2.2. Conservation fonctionnelle des Rho

Le génome du nématode *C. elegans* code pour 6 GTPases Rho : une *Rho* (*rho-1*) ; une *Cdc42* (*cdc-42*) ; deux *Rac* similaires à *Rac1* des vertébrés (*ced-10* et *rac-2*) ; une *Rac* (*mig-2*) similaire à *RhoG* chez les vertébrés (d'après deBakker *et al.*, 2004) ; une *Wrch1* (*Wnt-1* responsive *Cdc42* homolog) et une autre GTPase conservée *Cdc42-like* (*crp-1*) impliquée dans le trafic membranaire (Jenna *et al.*, 2005). *Wrch1* contrôle le réarrangement du cytosquelette en aval de *Wnt-1* chez les mammifères, mais il n'a pas encore été démontré que ce gène est exprimé chez *C. elegans* (Tao *et al.*, 2001). Ces GTPases possèdent 40 régulateurs : 22 Rho GAP, 19 Rho GEF et 1 Rho GDI (Lundquist, 2006). *C. elegans* possède également 13 Rho GAP conservées qui ont des homologues chez les mammifères (voir Figure 2.1).

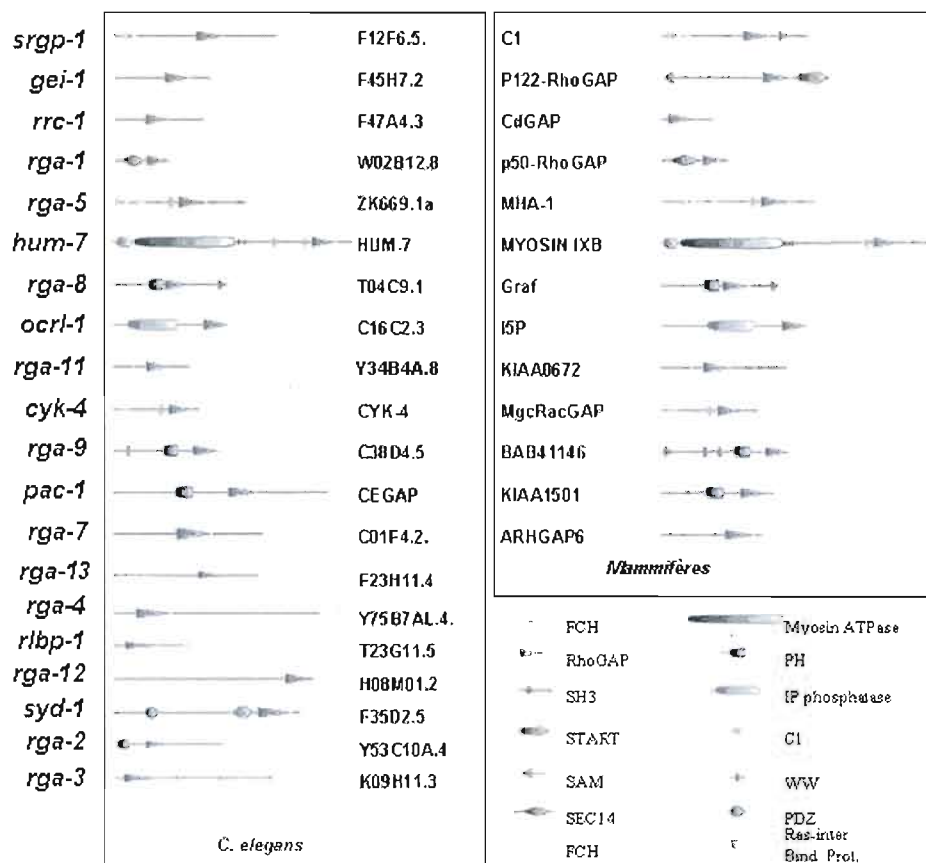


Figure 2.1 Les Rho GAP chez le nématode *C. elegans* et leurs orthologues chez les mammifères

Le génome de *C. elegans* a été prédit pour coder 22 Rho GAP (dans cette figure, seulement 20 sont représentées). Ces protéines sont multifonctionnelles pour la plupart (Tcherkezian et Lamarche-Vane, 2007). À droite de la figure, 13 homologues de séquences des Rho GAP du nématode ont été répertoriés parmi 70 Rho GAP prédites chez les mammifères. (Cette figure a été aimablement fournie par la Dre S. Jenna).

La famille des Rho est largement impliquée dans le développement embryonnaire du nématode *C. elegans*. La cytokinèse est régulée par *rho-1* qui régule la contractilité de l'actomyosine via la Rho kinase *let-502*. L'activité de *rho-1* est régulée par la GAP *cyk-4* et la GEF *ect-2* qui ont pour homologue respectivement *MgcRacGAP* et *ECT2* chez les vertébrés (Jantsch-Plunger *et al.*, 2000 ; Piekny et Mains, 2002 ; Kitamura *et al.*, 2001 ; Morita *et al.*, 2005). *cdc-42* et *rho-1* coordonnent la contractilité de l'actomyosine et la localisation des protéines *PAR* pendant l'établissement de la polarité de l'embryon de

C. elegans (Gotta *et al.*, 2001 ; Kay et Hunter, 2001 ; Schonegg et Hyman, 2006). La GEF *ect-2* active *rho-1* lors des évènements de cytokinèse.

Au stade 26 cellules commence la gastrulation, plusieurs types de cellules migrent, dont les cellules P. *ect-2* et *unc-73* régulent l'action de *rho-1* au cours de cette migration des cellules P (Morita *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter que les GTPases *rac-2*, *ced-10* et *mig-2* contrôlent la migration des cellules P de manière redondante et parallèle avec *rho-1* (Spencer *et al.*, 2001). La littérature nous dit également que *rho-1* régulée par les GAP *rga-3* et *rga-4*, contrôle l'activation de *let-502* (effecteur) dans la formation de la lignée germinale P de l'embryon précoce (100-200 cellules) de *C. elegans* (Schmutz *et al.*, 2007).

La formation de canaux excrétoires à environ 300 cellules, est contrôlée par *cdc-42* et la Rho GEF *exc-5* qui a pour homologue FGD1 chez les mammifères (impliquée dans la diplasie facio-génitale). *exc-5* contrôle la morphogénèse de la cellule excrétoire c'est-à-dire la formation des surfaces apicales versus basolatérales de cette cellule (Gao *et al.*, 2001).

Juste avant l'élongation, les cellules dorsales de l'hypoderme vont migrer vers la ligne centrale du ventre de l'embryon où elles vont se rejoindre pour envelopper l'embryon. *wsp-1* qui a pour homologue la protéine humaine du syndrome Wiskott-Aldrich (WASP), est un effecteur de *cdc-42* qui active le *Arp2/3*, un complexe de ramification et de nucléation de l'actine qui a un rôle primordial dans la fermeture ventrale de l'hypoderme (Williams-Masson *et al.*, 1997 ; Sawa *et al.*, 2003). Lors de l'élongation, *let-502* (effecteur de *rho-1*) augmente la contraction dans les cellules latérales pendant que *mel-11* et *rga-2*, la Rho GAP de *rho-1* inhibent ce processus dans les cellules ventrales et dorsales (Wissmann *et al.*, 1999 ; Diogon *et al.*, 2007 ; Wissmann *et al.*, 1997). *mig-2* et Rac/Rho GEF *unc-73* agissent de façon synergique avec *mel-11* dans ce processus. *unc-73* agit comme une GEF pour *rho-1*, *ced-10*, et *mig-2* (Spencer *et al.*, 2001 ; Steven *et al.*, 1998 ; Wu *et al.*, 2002).

Chez *C. elegans* tout comme chez les mammifères, *rho-1* intervient dans la morphogénèse des neurones (Chen et Lim, 1994). De même, *ced-10*, *rac-2* et *mig-2* sont impliquées dans la guidance axonale (Lundquist *et al.*, 2001).

À ce jour, seules quatre Rho GAP sur 22 (*rga-2*, -3, -4 et *cyk-4*) ont été caractérisées comme jouant un rôle dans le développement embryonnaire du vers *C. elegans* (voir Figure 2.2), or toutes semblent être exprimées dans l'embryon (SAGE data, <http://elegans.bcgsc.bc.ca/>). De nombreux mécanismes impliquant des GTPases Rho n'ont

pas encore permis d'identifier de Rho GAP tels que la gastrulation, la fermeture ventrale de l'embryon... etc. Nous pouvons donc envisager que ces activités GAP manquantes feraient intervenir des protéines fonctionnant de façon redondante.

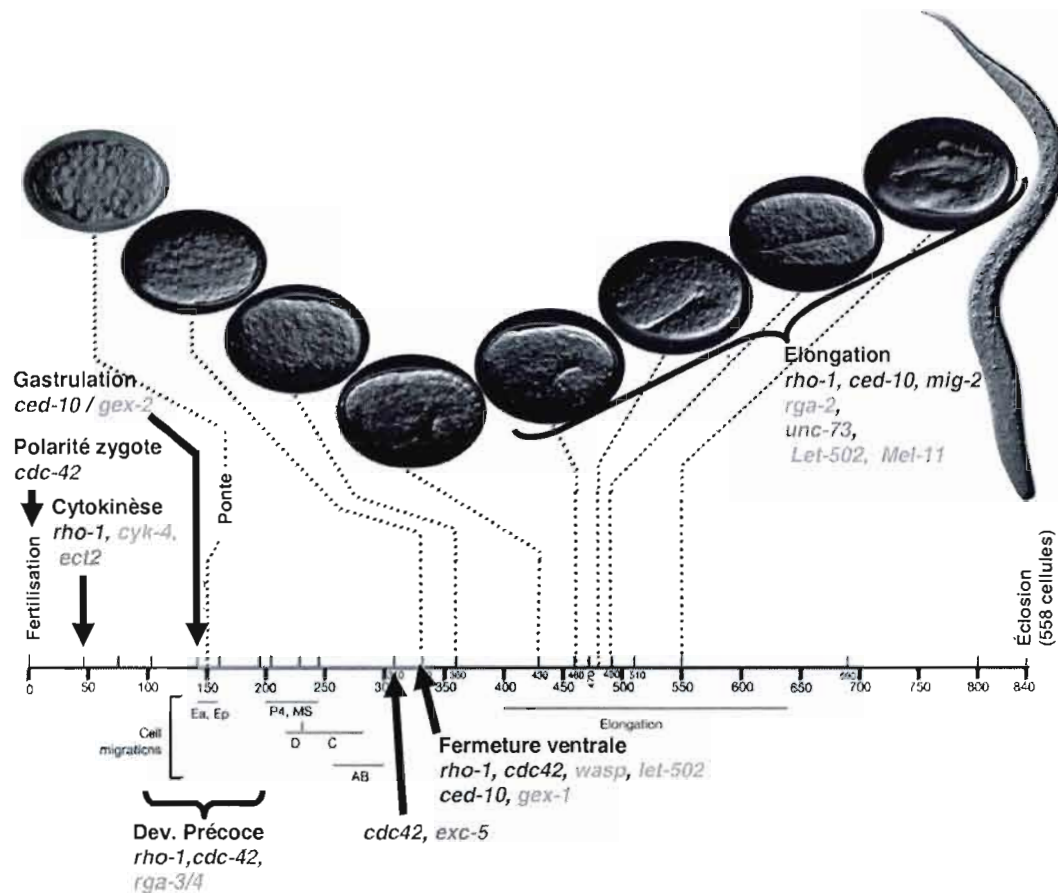


Figure 2.2 Implication de la famille des Rho au cours du développement embryonnaire du nématode *C. elegans*

Légende : *Rho GTPase*, *Rho GAP*, *Rho GEF*, *Effecteur*. Photo tirée de wormatlas, modifiée par E. L. Boulter.

La polarité du zygote est contrôlée par *cdc-42*. *rho-1*, *cyk-4* et *ect-2* contrôlent la cytokinèse. La gastrulation est contrôlée par la GTPases *ced-10* et l'effecteur *gex-2*. *rho-1* et *cdc-42* sont les GTPases qui contrôlent le développement précoce de l'embryon, ainsi que les GAP *rga-3* et *rga-4*. La fermeture ventrale de l'embryon est sous le contrôle de *rho-1*, *cdc-42* et *ced-10*. Enfin l'élongation est contrôlée par trois GTPases : *rho-1*, *ced-10* et *mig-2*.

OBJECTIFS DE CE PROJET

Ce projet s'inscrit dans un objectif à long terme du laboratoire de génomique intégrative et signalisation cellulaire, qui vise à cartographier la machinerie de régulation des Rho GTPases chez le nématode afin de mieux comprendre les mécanismes d'intégration des voies de signalisation au cours du développement et de la vie des organismes multicellulaires. Dans ce contexte, ce projet de maîtrise vise à identifier le rôle de Rho GAP au cours du développement embryonnaire du *C. elegans*. Le projet présente deux volets, l'un étant de caractériser la spécificité catalytique des Rho GAP envers les Rho GTPases *in vitro*; et l'autre étant d'étudier les interactions fonctionnelles des Rho GAP au cours du développement embryonnaire du *C. elegans in vivo*.

DEUXIÈME PARTIE

Caractérisation de la spécificité catalytique des Rho GAP envers les Rho GTPases

Comme nous l'avons vu, le génome de *C. elegans* code pour 22 Rho GAP et 6 Rho GTPases. Actuellement nous ne connaissons pas la spécificité catalytique de toutes les Rho GAP envers les Rho GTPases. Il serait donc intéressant de développer des méthodes d'identification de ces spécificités *in silico* et *in vitro*.

CHAPITRE 1

Identification de la spécificité de liaison des Rho GTPases avec les Rho GAP *in silico*

Génération d'un modèle prédictif d'interactions protéiques spécifiques entre les Rho GAP et les Rho GTPases

Boulier Élodie L., Harel Sharon A., Vo Nhu Ha

Ce travail a été effectué dans le cadre du cours de Bioinformatique avancée (BIF7001) de l'UQÀM sous la supervision du professeur M. Diallo Abdoulaye Baniré. Chaque auteure a participé équitablement au projet. Mme Vo, bachelière en bioinformatique a travaillé sur la programmation, alors que Mme Harel (étudiante en maîtrise de biochimie) et moi-même avons travaillé sur le reste du projet.

Ce projet est inséré dans ce mémoire car il peut être un outil pour déterminer la spécificité d'interaction entre les Rho GAP et les Rho GTPases chez l'humain et chez *C. elegans*.

Note : La validation du prédicteur dans la partie résultats et la discussion du travail original ont été modifiées par mes soins en vue de leur amélioration. Ces parties peuvent donc être considérées comme une contribution personnelle.

RÉSUMÉ

La spécificité d'interaction entre les Rho GAP (Rho GTPase Activating Protein) et les Rho GTPases, ne peut être identifiée en se basant uniquement sur la séquence primaire des protéines. Une hypothèse suppose que la spécificité d'interactions, pourrait être contenue dans la structure tridimensionnelle (3D) du domaine catalytique de la Rho GAP. Afin de réduire le temps passé en laboratoire pour identifier le réseau d'interactions entre les Rho GAP et les Rho GTPases chez l'humain et de vérifier cette hypothèse, nous présentons ici une approche qui permet d'obtenir des prédictions d'interactions. Cette approche se base sur l'alignement des structures 3D des Rho GAP via l'utilisation d'outils bioinformatiques reconnus et déjà développés, comme DALI, Combinatorial Extension (CE) et MAMMOTH. CE s'est avéré être le logiciel le plus efficace pour la génération de prédictions et plusieurs validations expérimentales trouvées dans la littérature ont confirmé la spécificité du prédicteur tout en justifiant l'utilisation de *C. elegans* comme modèle expérimental.

1. Introduction

Il a été prédit que le génome humain code entre 59 et 70 RhoGAP. Mais la redondance de ces Rho GAP constitue un problème majeur pour étudier la fonction de ces protéines. En effet, seuls un peu plus de la moitié ont été caractérisées (Tcherkezian et Lamarche-Vane, 2007). Le génome du nématode *Caenorhabditis elegans* code pour 6 GTPases Rho et 22 Rho GAP (Lundquist, 2006). La redondance existe donc aussi chez le nématode mais la quantité de protéines à caractériser est moindre que chez l'humain.

Comme nous l'avons vu, des études ont montré que la spécificité des Rho GAP pour les Rho GTPases se trouverait plutôt dans la structure tridimensionnelle du domaine GAP (Jenna et Lamarche-Vane, 2004). C'est sur ces données que nous avons basé notre étude qui consistait à prédire les interactions des Rho GAP pour les Rho GTPases humaines. Pour cela nous avons employé toutes les données dans la littérature sur les interactions connues.

Notre approche nécessite la connaissance de ces interactions mais aussi la comparaison des structures tertiaires. L'alignement structural est une forme d'alignement de séquence qui se base sur la structure tridimensionnelle de la protéine. Plusieurs outils d'alignements structuraux tridimensionnels ont été développés afin de contribuer entre autre à l'effort de classification des protéines, mais aussi à l'établissement des liens d'évolution. Ces outils peuvent aussi être utilisés pour identifier des similarités ou différences de structures

entre des protéines de même famille. Parmi ces logiciels, DALI utilise une méthode de matrice d'alignement de distances, (Holm et Park, 2000; Holm *et al.*, 1992), MAMMOTH-mult (Ortiz *et al.*, 2002) décompose une séquence en heptapeptide et utilise une approche vectorielle pour la comparaison, qui est d'ailleurs utilisé conjointement à Rosetta, un logiciel de prédiction très utilisé et CE, similaire à DALI, qui roule dans un environnement Linux et est codé en langage C. Pour ce dernier programme, l'université de Californie a développé un nouvel algorithme qui s'appelle Combinatorial Extension (CE) (Shindyalov et Bourne, 1998). Cet alignement local, aligne les paires de fragments de Carbones- α . Par la suite, l'algorithme de Monte Carlo est appliqué pour itérer globalement et ainsi permettre l'optimisation du résultat (Guda *et al.*, 2001). Ces trois logiciels, DALI, MAMMOTH et CE, nécessitent en entrée un fichier « Protein Data Bank » (PDB) contenant les coordonnées tridimensionnelles de chacun des acides aminés de la séquence d'intérêt, dans notre cas : le domaine Rho GAP. Cette séquence sera comparée à une banque de données (PDB) ou encore à une seconde séquence d'intérêt pour l'utilisateur. Ces logiciels requièrent une connaissance structurale des protéines étudiées. Par conséquent, ils dépendent de la disponibilité des structures sur PDB.

La famille des Rho GAP est très peu représentée sur PDB et l'approche présentée dans cet article montre le potentiel prédictif de 3 logiciels d'alignement structuraux (DALI, MAMMOTH et CE) et ce avec des structures prédites plutôt que des structures provenant d'expérience de RMN ou cristallographie aux rayons X. Le modélisateur de structures 3D calculées, Swiss-Model, a été utilisé pour la prédiction des structures 3D en mode automatique (Schwede *et al.*, 2003 ; Guex et Peitsch, 1997 ; Arnold *et al.*, 2006).

Finalement, CE présentant le meilleur potentiel prédictif, il a été adapté à nos besoins afin d'être capable de lire la base de données (fichiers PDB) que nous lui fournirons et de lire un fichier d'interaction entre les GAP et les GTPases. CE est disponible sur le web à l'adresse suivante : <http://cl.sdsc.edu/>.

Par la suite pour valider nos prédictions avec les Rho GAP humaines, nous avons utilisé les spécificités d'interactions connues dans la littérature sur *C. elegans* avec des Rho GAP qui ont des homologues humains.

2. Matériels et Méthodes

2.1. Recensement des interactions Rho GAP-Rho GTPases

Les interactions connues entre les Rho GAP et les Rho GTPases, ont été retirées de la littérature et sont rapportés dans le Tableau 1.1 (Jenna et Lamarche-Vane, 2004). Ces interactions serviront de GOLD STANDARD pour déterminer le potentiel d'interactions non caractérisées de Rho GAP avec des Rho GTPases humaines.

D'après Jenna S. et Lamarche-Vane N. (2004). "The Superfamily of Rho GTPase-Activating proteins." Rho GTPases. Molecular Biology Intelligence Unit, Landes Bioscience. ed. Symons M. pp 68-85.

2.2. Identification des domaines Rho GAP et générations des fichiers PDB

Les Rho GAP sont des protéines multimodulaires, contenant des domaines protéiques additionnels au domaine Rho GAP. Notre étude ne porte que sur le domaine Rho GAP qui contient toutes les séquences nécessaires à l'interaction de la GAP avec sa GTPase cible. Pour obtenir les domaines Rho GAP, un outil de recherche de module protéiques a été utilisé : SMART (Schultz *et al.*, 1998 ; Letunic *et al.*, 2006).

Les séquences des domaines Rho GAP recensés par SMART ont été rassemblées et leurs structures tridimensionnelles ont été modélisées si nécessaire en utilisant SWISS-MODEL en mode automatique (Schwede *et al.*, 2003; Guex et Peitsch, 1997 ; Arnold *et al.*, 2006).

Les fichiers PDB des coordonnées 3D prédites par SWISS-MODEL ont été rassemblés dans un fichier pour comparaison ultérieure. Les séquences des domaines Rho GAP pour le GOLD STANDARD ont été recueillies selon la même méthode et leurs structures 3D ont également été prédites selon la même méthode.

Pour toutes les modélisations avec SWISS-MODEL, un contrôle a été fait pour s'assurer que les modèles utilisés pour la génération des structures 3D étaient toujours des domaines Rho GAP.

2.3. Recensement de structures pour contrôler le taux de faux positifs

Le domaine possédant une activité GAP pour les protéines G trimériques a été choisi pour évaluer la probabilité de faux positifs (FP). Ce domaine appelé RGS a été identifié sur SMART et les fichiers des structures 3D ont été obtenus directement sur PDB. Au total 12 fichiers correspondants au domaine RGS ont été utilisés.

MODEL en mode automatique (Schwede *et al.*, 2003; Guex et Peitsch, 1997 ; Arnold *et al.*, 2006).

Les fichiers PDB des coordonnées 3D prédites par SWISS-MODEL ont été rassemblés dans un fichier pour comparaison ultérieure. Les séquences des domaines Rho GAP pour le GOLD STANDARD ont été recueillies selon la même méthode et leurs structures 3D ont également été prédites selon la même méthode.

Pour toutes les modélisations avec SWISS-MODEL, un contrôle a été fait pour s'assurer que les modèles utilisés pour la génération des structures 3D étaient toujours des domaines Rho GAP.

2.3. Recensement de structures pour contrôler le taux de faux positifs

Le domaine possédant une activité GAP pour les protéines G trimériques a été choisi pour évaluer la probabilité de faux positifs (FP). Ce domaine appelé RGS a été identifié sur SMART et les fichiers des structures 3D ont été obtenus directement sur PDB. Au total 12 fichiers correspondants au domaine RGS ont été utilisés.

2.4. Modification du logiciel CE

Nos recherches sur les comparaisons de structure 3D nous ont amené au logiciel CE, développé par l'université de Californie à San Diego en 1998 (Guda *et al.*, 2001). Pour notre projet, l'algorithme de CE s'est avéré intéressant, en particulier son code source qui est facilement modifiable pour qu'on puisse ajouter nos composants. Nous avons donc ajouté du code au programme CE pour qu'il compare les séquences PDB d'entrée à une base de données ne contenant que les fichiers PDB correspondant aux structures des Rho GAP dont l'interaction est connue avec des Rho GTPases, soit notre GOLD STANDARD (voir Figure 1.1).

De plus, un fichier d'interaction entre les GAP et les GTPases a été ajouté, afin d'obtenir dans le résultat final, un lien entre la GAP et la GTPase avec laquelle elle a une possibilité d'interaction. Le logiciel modifié intègre toujours en entrée un fichier PDB et le

seuil acceptable de similarité (% similarité) entre deux structures tertiaires qui sera déterminé ultérieurement, mais qui fut fixé à 0 pour les premières analyses (voir Figure 1.1). CE modifié permet donc de comparer un fichier d'entrée avec les fichiers du GOLD STANDARD et de générer une réponse liant la similarité de structure entre les GAP avec une spécificité d'interactions. Les réponses sont retournées sous ce format (voir APPENDICE A pour la signification de chacune des données) :

Rmsd=1.11Å Z-Score=6.7 Gaps=5(3.5%) CPU=0s Sequence identities=31.5%

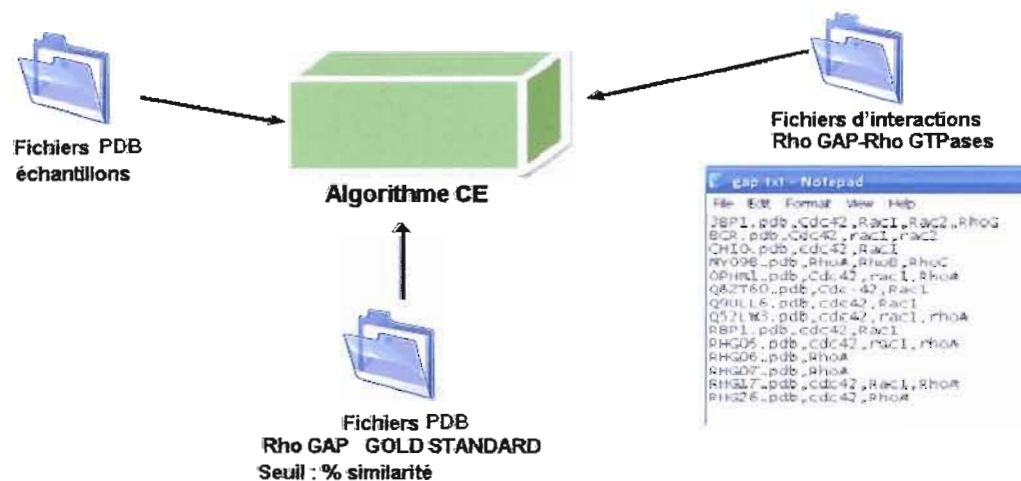


Figure 1.1 Structure du logiciel CE modifié

Le code du logiciel CE a été modifié, afin qu'il puisse comparer les séquences d'échantillons (sous forme PDB) au GOLD STANDARD qui est la base de données contenant les fichiers PDB des structures des Rho GAP dont on connaît les interactions avec des Rho GTPases. Et afin d'obtenir un lien entre la GAP et la GTPase avec laquelle elle a une possibilité d'interaction, un fichier d'interaction entre les GAP et les GTPases a été ajouté.

2.5. Analyse du GOLD Standard, RGS et des échantillons par CE

CE modifié a permis de faire la comparaison de la structure tertiaire des domaines Rho GAP. Pour déterminer la distribution des résultats des vrais positifs (VP) et des vrais négatifs (VN), une méthode similaire au « leave-one-out » a été utilisée. Au total 14 fichiers PDB composaient le GOLD STANDARD. Un fichier du GOLD STANDARD était comparé aux 13 fichiers restants.

Les résultats de similarité entre deux GAP possédant une interaction pour une même GTPase, ont été considérés VP. De la même façon les résultats de similarité entre 2 GAP connues pour ne pas partager la même interaction pour une même GTPase, ont été considérés VN. Ces étapes ont été répétées pour les 14 fichiers du GOLD STANDARD. Par la suite, la même méthode a été utilisée pour les domaines RGS, mais dans ce cas les pourcentages de similarités étaient considérés comme étant de faux positifs (FP).

Tous les résultats de similarité des VP, VN et des FP ont été recensés afin de pouvoir en observer la distribution. La distribution de tous ces résultats permet de déterminer un seuil au-dessus duquel les résultats sont supposés être de VP et ce avec un bon niveau de confiance. Finalement les fichiers des échantillons de Rho GAP ont pu être comparé par CE avec le GOLD STANDARD.

2.6. Analyse du GOLD Standard et RGS par MAMMOTH et DALI

Par la même méthode de comparaison des GOLD STANDARD, les résultats de comparaison (Z score) ont été recensés manuellement en utilisant l'interface WEB de MAMMOTH (<http://ub.cbm.uam.es/mammoth/pair/index3.php>) et DALI (<http://www.ebi.ac.uk/DaliLite/>), afin de comparer le potentiel de prédiction de ces deux approches.

2.7. Validation du prédicteur

Nous avons volontairement omis des interactions dans la littérature pour pouvoir faire la validation de notre prédicteur (voir Tableau 1.2). Nous avons également recensé toutes les interactions connues parmi les 13 Rho GAP de *C. elegans* ayant des homologues humains (voir Figure 2.1 de la première partie et Tableau 1.3).

Tableau 1.2 Liste des interactions de Rho GAP humaines de la littérature qui ont servi à valider notre prédicteur

Rho GAP Humaines	Interaction avec les Rho GTPases	Références
ARHGAP10	Cdc42	Dubois et Chavrier, 2005
MgcRacGAP	Cdc42 et Rac1	Touré <i>et al.</i> , 1998
RICH2	Cdc42 et Rac1	Richnau et Aspenström, 2001

Tableau 1.3 Liste des interactions des Rho GAP de *C. elegans* ayant des homologues humains

Note : Les Rho GAP humaines en gris font partie du GOLD STANDARD. Les GTPases en gras sont celles avec qui la GAP a une interaction plus forte qu'avec les autres GTPases.

Rho GAP <i>C. elegans</i>	Interaction avec les Rho GTPases	Références	Rho GAP Humaines homologues
<i>cyk-4</i>	<i>rho-1</i> , <i>rac-2</i> , <i>cdc-42</i>	Jantsch-Plunger <i>et al.</i> , 2000	MgcRacGAP
<i>gei-1</i>	<i>rho-1</i>	Ohara <i>et al.</i> , 2009	p122 Rho GAP
<i>hum-7</i>			MYOSIN IXB
<i>ocrl-1</i>			OCRL1
<i>pac-1</i>	<i>rho-1</i> , <i>rac-1</i> , <i>cdc-42</i>	Chen <i>et al.</i> , 1994	ARHGAP23
<i>rga-1</i>	<i>cdc-42</i>	Jenna <i>et al.</i> , 2005	ARHGAP1(p50)
<i>rga-5</i>	<i>rho-1</i> , <i>rac-1</i> , <i>cdc-42</i>	Saras <i>et al.</i> , 1997	MHA-1/PARG1
<i>rga-7</i>			ARHGAP6
<i>rga-8</i>			OPH-1
<i>rga-9</i>			ARHGAP12
<i>rga-11</i>			RICH2
<i>rrc-1</i>	<i>rac-1</i> , <i>cdc-42</i>	Delawary <i>et al.</i> , 2007	CdGAP
<i>srgpl</i>	<i>rac-1</i>	Neukomm <i>et al.</i> , 2009	ARHGAP4

3. Résultats

3.1. Prédiction des structures 3D

Sur les 14 domaines Rho GAP composant le GOLD STANDARD, 13 structures ont été prédites par SWISS-MODEL, et une seule était disponible sur PDB. Des 91 échantillons de domaines de Rho GAP humaines recensés sur SMART, 9 n'ont pu être prédit par manque d'homologie avec les structures disponibles sur PDB. Des 82 domaines Rho GAP restant, 8 domaines cristallisés étaient disponibles sur PDB et leurs coordonnées ont été utilisées directement. Les 74 domaines restant ont dû être prédit et ce toujours à partir des mêmes 8 modèles existant sur PDB. Ceci ajoute un facteur de redondance dans nos résultats.

3.2. Détermination du seuil de confiance et validation *in silico*

La distribution des résultats obtenus pour le GOLD STANDARD a été évaluée en déterminant la fréquence de représentation des divers scores Z des VP et VN obtenus avec les 3 logiciels. À la Figure 1.2, on voit en A, B et C que les VP et VN obtenu avec le score Z (les résultats de comparaison) de CE, DALI et MAMMOTH ne présentent aucun potentiel prédictif vu le grand recouvrement des résultats.

Par contre, les scores obtenus pour RGS ne chevauchent aucunement les scores Z des VP et VN (données non montrées sur la figure). Donc les scores Z de ces trois logiciels ne nous ont permis que de confirmer l'appartenance des Rho GAP à une même famille. Pour DALI, tous les scores Z d'alignement sont au-dessus de la limite de 2 entre les GAP et en dessous de 2 entre les GAP et RGS (voir Figure 1.2 B). Pour CE, tous les scores Z entre les GAP, sont au dessus de 4,5 et par conséquent représentent des protéines appartenant à la même famille. Alors qu'ils sont sous la valeur de 3,7 lorsque les GAP sont comparées avec les RGS, indiquant une similarité peu significative (voir Figure 1.2 A). On observe la même tendance avec les résultats de MAMMOTH (Figure 1.2 C).

Le logiciel CE offre une seconde donnée soit le pourcentage d'identité des séquences. Cette valeur représente le pourcentage de similarité des positions alignées, mais se basant sur l'alignement structurel. Nous avons rassemblé la distribution des pourcentages de similarité produit par l'algorithme de CE et ces données ont permis la validation *in silico*.

Sur la Figure 1.3, on observe que les domaines RGS (vrai négatifs non liés) ont un pourcentage de similarité de 0 % à 20 % avec le GOLD STANDARD. Cette faible similarité, telle qu'attendue, est due au fait que les RGS n'ont pas la même structure tertiaire que le GOLD STANDARD et ceci s'explique par le fait qu'*in vivo*, les RGS n'interagiront jamais avec les Rho GTPases.

Tous les résultats de VP et VN se situent au dessus de 20 % de similarité et il n'y a aucun chevauchement avec les pourcentages de similarités avec les RGS. Ceci confirme qu'il y a 0 % de probabilité d'obtenir un faux positif pour une protéine qui serait d'une famille plus éloignée. La forte concentration de données de 20 % à 40 %, s'explique selon les logiciels de classification par l'appartenance de ces protéines à une même famille. Il est normal de retrouver une similarité structurelle autour de 30 % entre les membres d'une même famille de protéines. Certaines de nos données dépassent les 40 % de similarité, ce qui signifie qu'il existe une forte ressemblance de leur structure 3D.

Ces informations analysées nous ont permis de déterminer un seuil au-delà duquel nous pouvons avoir confiance en nos résultats. Nous avons choisis un seuil très conservateur de 37 % au-delà duquel nous rencontrons 0 % de VN.

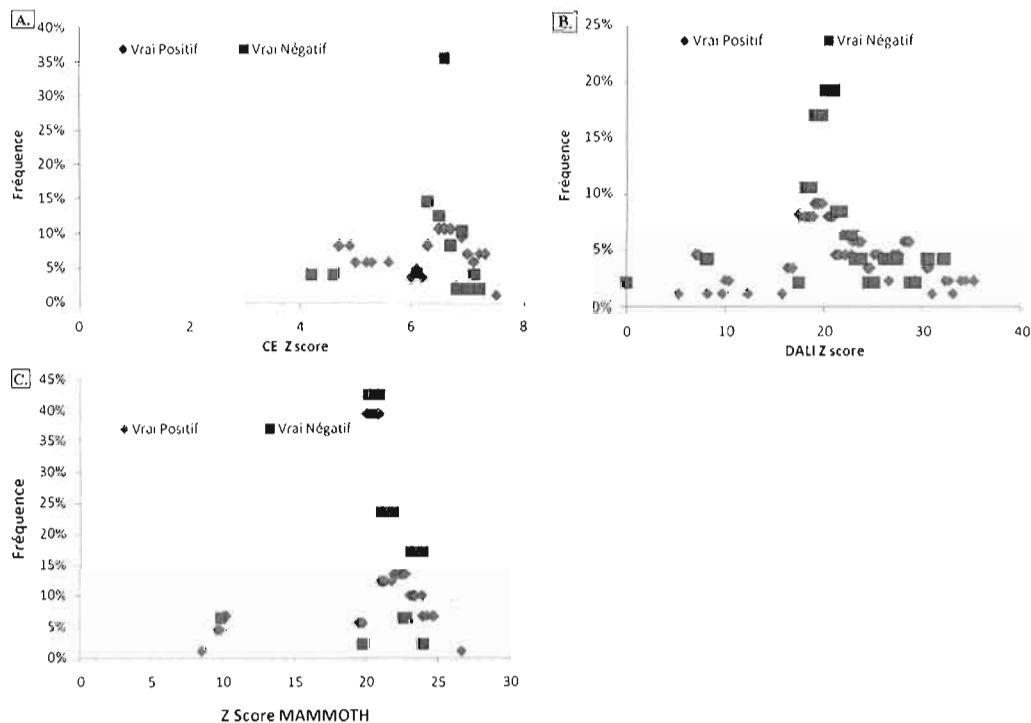


Figure 1.2 Distribution des résultats de comparaison (scores Z)

Distribution des scores Z pour A) CE, B) DALI et C) MAMMOTH lors de la validation *in silico*, soit la comparaison structurelle des GAP du GOLD STANDARD entre elles. Les scores Z pour deux GAP interagissant avec une même GTPase, et dont l'une est rapportée dans la littérature pour interagir positivement avec la GTPase, ont été considérés comme des scores vrais positifs (VP). Les scores Z entre deux GAP interagissant avec une même GTPase, et dont l'une est rapportée dans la littérature pour interagir négativement avec la GTPase, sont considérés comme des scores vrais négatifs (VN). Les scores Z pour les domaines RGS ne sont pas rapportés, mais ne chevauchent pas les scores Z des VP et VN.

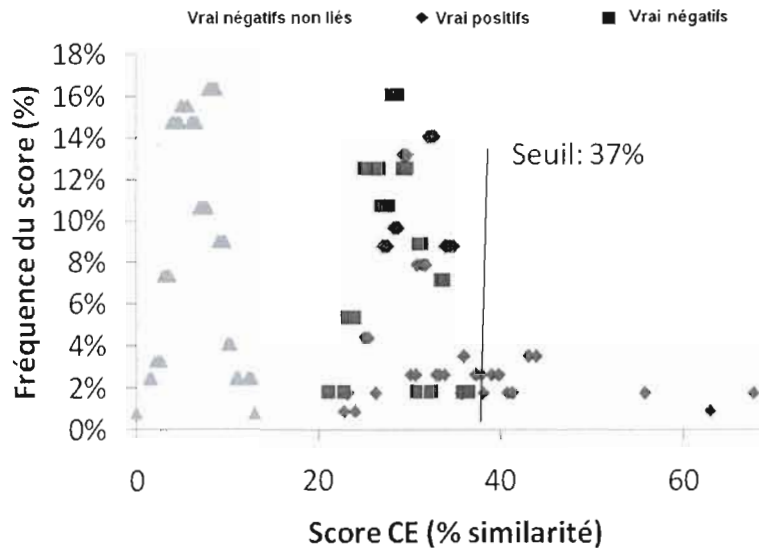


Figure 1.3 Détermination du seuil du prédicteur CE modifié

Pour déterminer la valeur seuil du prédicteur, la distribution des pourcentages de similarité obtenue par CE a été représentée sur ce graphique. En vert, on observe la distribution des pourcentages de similarité entre les domaines Rho GAP et les domaines RGS (vrai négatifs non liés), en rouge la distribution des scores pour les VN et en bleu les scores pour les VP. Une séparation nette existe dans la distribution des pourcentages de similarité à partir de 37 %, la valeur seuil a ainsi été fixée.

3.3. Analyse des prédictions

Suite à la fixation du seuil, toutes les prédictions ont été recensées pour les 82 échantillons de domaines Rho GAP. Au total 154 prédictions ont été générées, soit une moyenne de deux prédictions par protéines (voir APPENDICE B).

Par contre, il a été noté que 23 GAP sont restées sans prédictions. Ceci peut-être expliqué par la sous représentation de certaines GTPases interagissant avec les Rho GAP du GOLD STANDARD. En effet, parmi toutes les Rho GTPases humaines certaines n'ont pas d'interactions connues ce qui fait qu'elles ne sont pas représentées dans le GOLD STANDARD. Il se pourrait que ces 23 GAP interagissent justement avec ces GTPases dont on ne connaît pas d'interaction avec des GAP.

Étant donné que 74 domaines GAP, parmi les 82 échantillons, ont nécessité la prédiction de leurs structures 3D à partir des mêmes 8 modèles, il est possible qu'il existe un

facteur de redondance dans les prédictions. Afin d'évaluer l'effet de ce facteur, le nombre de prédictions dépendantes d'un même modèle entre l'échantillon et le Standard a été recensé. On observe 74 prédictions sur 154 qui sont dépendantes du modèle utilisé par SWISS-MODEL. Ce qui représente 51 % de prédictions totalement indépendantes du modèle utilisé pour prédire la structure 3D.

3.4. Validation du prédicteur

Les meilleurs scores obtenus par la Rho GAP 10/*ARHGAP10* avec les GAP du GOLD STANDARD sont les suivants : 65,3 % avec *ARHGAP26*; 54,9 % avec *oligophrénine-1*; 39,4% avec le clone *BRAMY3017920* et 37,1% avec *béta-chimaerin*. Toutes ces GAP du GOLD STANDARD ont pour point commun d'interagir (entre autre) spécifiquement avec *Cdc42* (voir APPENDICE B). En 2005, Dubois et Chavrier ont démontré qu'*ARHGAP10* interagit bien avec *Cdc42* (voir Tableau 1.2). Il est intéressant de noter que les quatre GAP du GOLD STANDARD ont eu leurs structures prédites avec deux patrons différents : 2osa pour le clone *BRAMY3017920* et 1xa6A pour les autres et qu'*ARHGAP10* a eu sa structure prédite à partir de 2osa. Il n'y a donc pas d'influence du patron de modélisation entre *ARHGAP10* et 3 des GAP du GOLD STANDARD (exception faite pour le clone *BRAMY3017920*) (voir APPENDICE C et APPENDICE D).

La GAP *MgcRacGAP* a obtenu un score de 44,6 et de 39,3% pour respectivement le clone *BRAMY3017920* et BCR du GOLD STANDARD qui toutes deux lient *Cdc42* et *Rac1* (voir APPENDICE B). Or le groupe Touré *et al.* en 1998, a démontré la spécificité de *MgcRacGAP* pour *Cdc42* et *Rac1*. Cette fois-ci encore, il n'y a pas d'influence du patron de modélisation entre les GAP du GOLD STANDARD et *MgRacGAP* car les protéines du GOLD STANDARD ont eu leurs structures prédites à partir de 2osa alors *MgcRacGAP* a eu sa structure prédite avec 2ovja (voir Tableau 1.2, APPENDICE C et APPENDICE D).

La Rho GAP *RICH2* a obtenu des scores élevés avec *ARHGAP17* et *3BP1* soit respectivement 71,2% et 60% qui ont pour point en commun de lier (entre autres) *Cdc42* et *Rac*. *RICH2* a obtenu également 39,7% avec le clone *BRAMY3017920* et 38,4% avec *BCR*

qui lie uniquement *Cdc42* et *Rac* (voir APPENDICE B). En 2001, Richnau et Aspenström ont démontré que *RICH2* lie *Cdc42* et *Rac1*. D'autre part, ils ont montré que *RICH1*, *RICH2* et *3BP1* ont un haut degré de similitude, ce qui appuie le score élevé de 60 % que *RICH2* a obtenu avec *3BP1*. Nous n'observons pas d'influence du patron de modélisation entre *RICH2* et les GAP du GOLD STANDARD car leurs patrons de modélisation sont différents (voir Tableau 1.2, APPENDICE C et APPENDICE D).

ARHGAP23 a obtenu 40,1% avec *BCR*, 37,9% avec le clone *BRAMY3017920* et 37,1% avec *CHIO*. Ces trois Rho GAP lient toutes *Cdc42* et *Rac* (voir APPENDICE B). *BCR* et le clone *BRAMY3017920* n'ont pas le même modèle de modélisation de structure qu'*ARHGAP23* (voir APPENDICE C et APPENDICE D). Il est intéressant de remarquer qu'*ARHGAP23* a pour plus proche homologue chez *C. elegans* *pac-1* (C04D8.1). Ce résultat a été obtenu en utilisant l'interface web de BLAST/BLAT sur www.wormbase.org qui a comparé la séquence humaine d'*ARHGAP23* avec la banque de donnée de protéines du *C. elegans*. Et il a été démontré que *pac-1* interagit avec *cdc-42* (homologue de *Cdc42* humaine), *rac-1* (homologue de *Rac* humaine) et *rho-1* (voir Tableau 1.3 ; Chen *et al.*, 1994).

Pour finir *CdGAP* qui fait parti du GOLD STANDARD a obtenu un score de 43,1% avec le clone *BRAMY3017920* qui lie les mêmes GTPases que *CdGAP* soit : *Cdc42* et *Rac1* (voir APPENDICE B). Cependant, il est possible qu'il y ait une influence du patron de modélisation car les deux GAP ont eu leurs structures prédites à partir de Zosa (voir APPENDICE C et APPENDICE D). Le plus proche orthologue de *CdGAP* chez *C. elegans* est *rrc-1* qui inactive *rac-1* et *cdc-42* (les homologues respectivement de *Rac* et de *Cdc42* humaine) (voir Tableau 1.3 ; Delawary *et al.*, 2007).

Ces validations permettent d'une part de confirmer la spécificité de notre prédicteur mais aussi de justifier l'utilisation de *C. elegans* comme modèle d'organisme multicellulaire pour l'étude de la famille des Rho chez l'humain.

4. Discussion et conclusions

4.1. GOLD STANDARD et référence d'interactions

Les interactions qui ont servi de référence pour l'établissement du GOLD STANDARD sont primordiales. Dans le cas présent le GOLD STANDARD pourrait être grandement amélioré. Premièrement par l'ajout d'interactions négatives qui sont moins nombreuses que les interactions positives. De plus l'obtention d'un standard de taille plus grande, pourrait permettre de tenir compte des GTPases qui ne sont pas représentées dans cette étude. Finalement, comme vous pouvez l'observer dans le Tableau 1.1, les interactions elles-mêmes sont assez redondantes du fait qu'elles ont été testées seulement avec huit GTPases sur la vingtaine qui existe chez l'humain.

Il serait intéressant d'ajouter à notre approche une composante permettant l'intégration des données catalytiques. Par exemple, en utilisant la spécificité d'interaction d'une GAP pour plusieurs GTPases avec les constantes d'activité catalytique spécifiques pour chacune. Ceci permettrait de connaître la ou les interactions préférentielles d'une GAP avec des GTPases.

4.2. Prédiction des structures 3D

Dans cette étude une approche assez simple de prédiction de structure 3D a été utilisée. La méthode de prédiction automatisée peut inclure plusieurs erreurs. Certaines méthodes supervisées, plus longue, mais plus précises pourraient être utilisées. Une méthode où nous utiliserions un alignement des domaines Rho GAP en 3D, permettrait de considérer la conservation structurelle, souvent mieux conservée, que la séquence primaire elle-même, et pourrait aussi permettre de générer de meilleurs modèles 3D.

Finalement, la meilleure approche serait d'intégrer les résultats de prédictions 3D de plusieurs méthodes. Mais toutes ces approches n'équivaldront jamais la qualité des données de cristallographie ou de RMN.

4.3. Pouvoir de prédiction et comparaison avec DALI et MAMMOTH 3

L'approche que nous avons empruntée au cours de ce projet semble nous avoir conduit à des résultats satisfaisants et valides.

Les performances de DALI et MAMMOTH ont permis d'attribuer l'identité de famille et non pas de générer des résultats satisfaisants pour la prédiction d'interaction entre GAP et GTPases. Seul CE a donné une meilleure ségrégation des VP et VN et nous a permis de déterminer un seuil au-delà duquel nous pouvons en théorie corrélérer une similitude structurelle avec la spécificité catalytique des GAP (voir Figure 1.2 et Figure 1.3).

Nous avons validé cinq interactions de la littérature avec les GAP *ARHGAP10*, *MgcRacGAP* et *RICH2*. Une autre approche aurait pu être d'évaluer la structure 3D d'une GAP et d'une GTPases lorsqu'elles sont liées et de vérifier un emboîtement de structure. Il est possible que cette approche combinée à celle utilisée dans notre étude puisse donner de bien meilleurs résultats.

Cependant, le potentiel de prédiction du pourcentage de similarité dans CE par rapport aux autres méthodes et au score Z, pourrait être dû à un simple effet de la définition de l'identité de séquence. On semble observer que la grandeur du score Z dépend de la taille des protéines comparées. En effet, une protéine plus petite, génère un score Z plus faible et ce même pour 2 protéines qui sont totalement identiques en structure. Ainsi la définition de CE pour l'identité de séquence, permet un alignement des acides aminés pairés, mais en ignorant les lacunes. Ceci permet de préserver des scores de similarité élevés et ce même si la séquence est plus courte. Donc, CE est capable de voir une similarité de structure dans des protéines de tailles différentes et c'est ce qui pourrait expliquer la différence et ce fameux pouvoir de prédiction. Par contre une avenue consolante, est l'absence de biais trop important dans les prédictions malgré l'utilisation de prédictions des structures 3D, soit seulement 49% de protéines qui sont influencée par le modèle. Ce résultat pourra être amélioré au fur et à mesure que les ressources de PDB grandiront.

Nous avons validé quatre interactions de la littérature avec les GAP de *C. elegans* *pac-1* et *rrc-1* homologues respectivement d'*ARHGAP23* et *CdGAP*. Ceci justifie d'utiliser cet animal comme modèle pour l'humain, puisque les interactions semblent bien conservées.

4.4. Perspectives

Nous pourrions restreindre l'alignement de structures aux seuls domaines de la GAP qui sont en contact avec la GTPase. En effet, les autres domaines ont peu d'intérêts et amènent surtout du bruit de fond dans notre prédiction.

Il faudrait éventuellement développer un réseau de neurones dans lequel on pourrait intégrer plusieurs types de données incluant :

- la prédiction de structure 3D à partir de différentes méthodes et l'identification d'un consensus,
- des données d'expression *in vivo* (type cellulaire, compartiments cellulaires) et dans le temps (stade de développement ou stade adulte) pour éviter de prédire une interaction entre des protéines qui ne se rencontrent jamais,
- les données sur l'affinité relative des GAP du GOLD STANDARD pour les Rho GTPases.

Ceci permettrait d'attribuer des probabilités variables d'interactions en attribuant un poids à ces données. Ce projet démontre les interactions entre les GAP et les GTPases selon la structure tertiaire de la protéine. Une recherche plus poussée sur d'autres facteurs qui peuvent influencer les interactions serait à découvrir. Ainsi, la continuité de cette étude peut amener à développer des réseaux de neurones et à obtenir des résultats plus concluants.

Ce projet avait pour objectif d'aider à déterminer la spécificité d'interaction *in silico* entre les Rho GAP et les Rho GTPases de l'humain, et cet outil peut s'appliquer aussi bien sur *C. elegans*. Ce projet pourra être validé par les essais expérimentaux sur toutes les Rho GAP de *C. elegans* que nous allons décrire dans le chapitre suivant.

CHAPITRE 2

Mise au point de la méthode d'identification de la spécificité de liaison des Rho GTPases avec les Rho GAP *in vitro*

1. Matériel et méthodes

1.1. Constructions de plasmides : principe de la technologie Gateway (Invitrogen™)

Cette méthode de clonage standardisé est commercialisée par la société Invitrogen™. Elle repose sur le transfert d'un gène cible dans différents vecteurs par recombinaison de sites spécifiques. Ces sites spécifiques de recombinaison (attB, L, R et P) sont en fait les sites naturels modifiés de recombinaison du bactériophage λ et d'*E. coli*. Cette technologie est simplement inspirée du processus naturel d'intégration et d'excision du bactériophage λ dans le génome d'*E. coli* (voir Figure 2.1). Comme les sites de recombinaison sont modifiés, ils permettent d'augmenter l'efficacité de recombinaison et le clonage directionnel (voir Figure 2.2 ; Rual *et al.*, 2004).

L'un des nombreux intérêts de cette technologie qui nous intéresse, est de produire des protéines recombinantes avec des étiquettes (His₆ ou GST en N-terminal) permettant par la suite de les purifier sur billes de Ni ou Glutathion-sépharose (Caruso *et al.*, 2005).

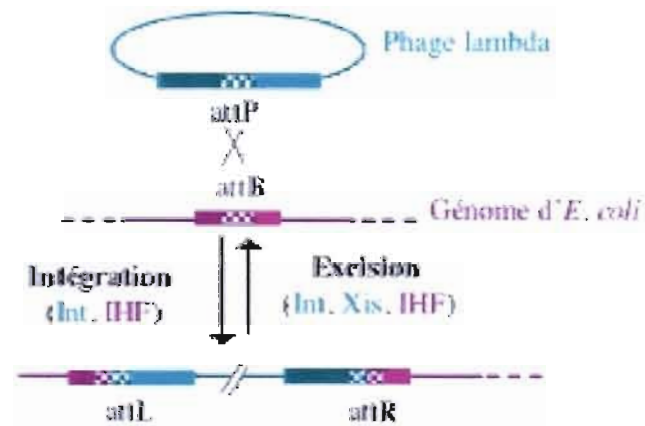


Figure 2.1 Intégration/Excision du bactériophage λ dans le génome d'*E. coli*

Les sites de recombinaison spécifiques se trouvent sur le génome de l'hôte (*attB*) et sur celui du bactériophage λ (*attP*). Ces sites permettent l'intégration réversible du génome du bactériophage dans celui de la bactérie *E. coli* catalysée par les intégrases (Int) et le facteur d'intégration (IHF). L'excision est catalysée en plus par l'excisionase (Xis). Int, Xis sont codées par le génome du bactériophage λ , alors que IHF est exprimé par *E. coli*.

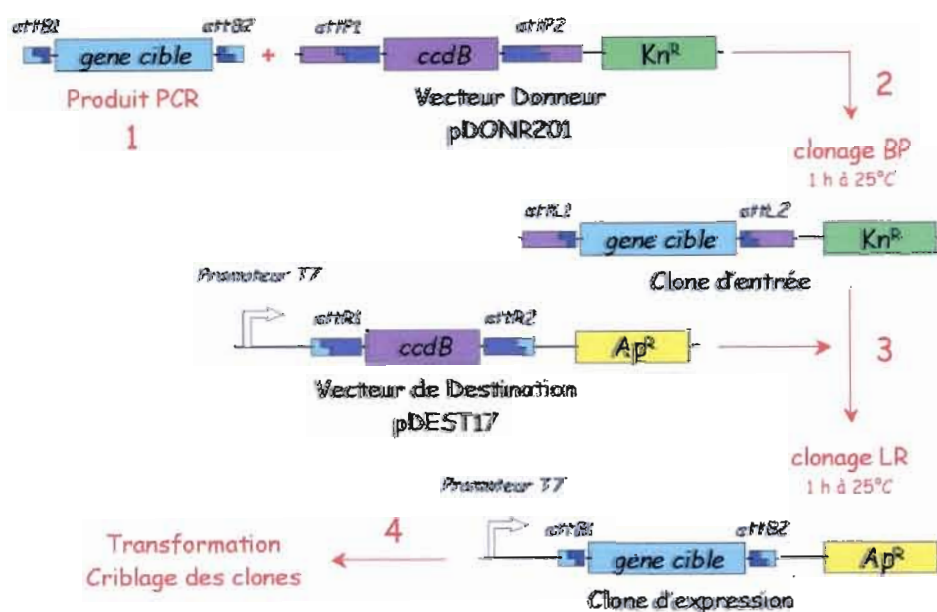


Figure 2.2 Technologie Gateway (Invitrogen™)

(1) Produit PCR : le gène cible est amplifié par PCR à l'aide d'amorces qui contiennent les séquences spécifiques de recombinaison *attB1* (amorce sens) et *attB2* (amorce anti-sens). Par la suite, les séquences *attB1* et *attB2* de 25 bases chacune sont fusionnées à chaque extrémité du gène cible. (2) Clonage du produit PCR dans un vecteur *pDONR201* en présence de la BP clonase. Cet enzyme catalyse la recombinaison entre les sites *attB* et *attP*. Ce vecteur ainsi obtenu sert à transformer des bactéries qui sont sélectionnée sur milieu contenant de la kanamycine (gène de résistance à la kanamycine : *Kn^R*) (3) Clonage du gène cible du vecteur *pDONR201* vers le vecteur *pDEST17* en présence de la LR clonase qui catalyse la recombinaison entre les sites *attL* et *attR*. (4) Transformation de bactéries *E. coli* avec le gène cible inséré dans le vecteur *pDEST17*, et sélection sur milieu contenant de l'ampicilline (gène de résistance à l'ampicilline : *Amp^R*). Les transformants portant le gène toxique *ccdB* (sous-produit des réactions 2 et 3) meurent ce qui permet d'obtenir un criblage très fin. De plus les transformants sont sélectionnés sur différents antibiotiques d'une étape à l'autre.

En utilisant la technologie Gateway (Invitrogen), les gènes des GTPases ont été recombinés dans un vecteur d'expression *pGEX-2TK* pour produire les protéines étiquetées GST en N-terminal et les gènes des GAP dans un vecteur d'expression *pDEST17* ou *pTrcHis* (voir Figure 2.3 et Figure 2.4) pour produire une protéine étiquetée *His₆* en N-terminal (Caruso *et al.*, 2005). Les constructions de plasmides des protéines recombinantes des Rho GAP et des Rho GTPases de *C. elegans* transformés respectivement dans des bactéries DH5α et Rosetta, ont toutes été fournies par le Dr S. Jenna. Les GAP *cyk-4* (K08E3.6), *gei-1*

(F45H7.2), *hum-7* (F56A6.2), *ocrl-1* (C16C2.3), *pac-1* (C04D8.1), *rga-1* (W02B12.8), *rga-2* (Y53C10A.4), *rga-3* (K09H11.3), *rga-4* (Y75B7AL.4), *rga-5* (ZK669.1a), *rga-13* (F23H11.4), *rga-7* (C01F4.2), *rga-8* (T04C9.1), *rga-9* (C38D4.5), *rga-10* (2RSSE.1), *rga-11* (Y34B4A.8), *rga-12* (H08M01.2), *rlbp-1* (T23G11.5), *rrc-1* (F47A4.3), *srgp-1* (F12F6.5), *syd-1* (F35D2.5) ; et les GTPases de *C. elegans* *cdc-42* (R07G3.1), *rac-2* (K03D3.10b), *ced-10* (C09G12.8b), *mig-2* (C35C5.4), *rho-1* (Y51H4A.3) et *crp-1* (Y32F6B.3), ont été obtenus de l'ORFeome de *C. elegans* (Reboul *et al.*, 2003).

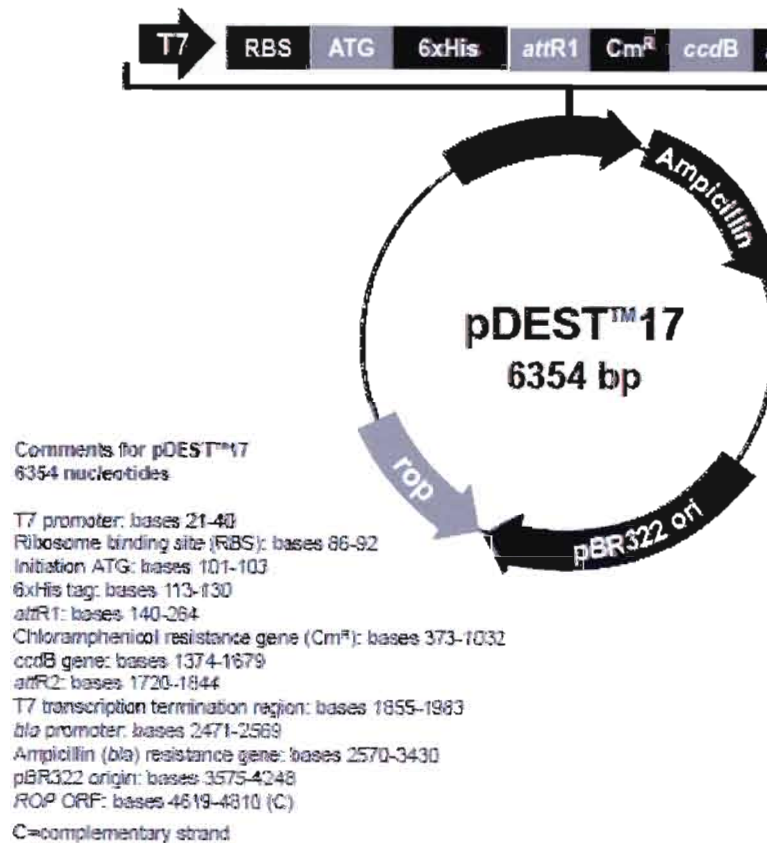


Figure 2.3 Plasmide pDEST™17 (Invitrogen™)

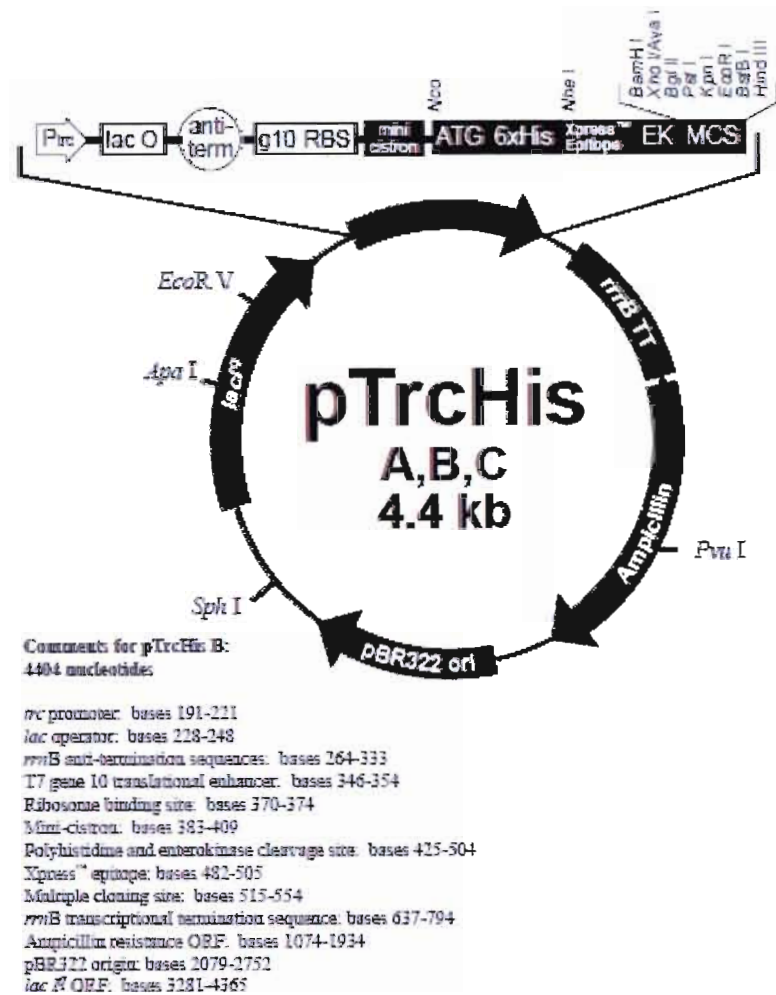


Figure 2.4 Plasmide pTrcHis (Invitrogen™)

1.2. Expression des protéines recombinantes

Les recombinants bactériens des GTPases-GST ont été exprimés comme décrit précédemment (Braun *et al.*, 2002). Les recombinants bactériens des GAP-His₆ ont été exprimés selon plusieurs protocoles utilisés ultérieurement dans le laboratoire du professeur S. Jenna (voir les Tableau 2.1 et Tableau 2.2). Ces protocoles ont été préalablement testés dans le laboratoire du Dre Jenna afin de maximiser la production des protéines recombinantes.

1. Les clones bactériens sont étalés sur un Pétri de LB agar (NaCl 10 g/L, Bactopeptone 10 g/L, extrait de levures 5 g/L, NaOH 2 perles/L, Agar 10 g/L) contenant 100 µg/ml d'ampicilline (préparé à 10 mg/ml dans l'eau ; Bioshop).
2. Après incubation pendant 16 heures à 37°C, une colonie isolée est mise en culture dans le milieu de préculture (indiqué dans le Tableau 2.1) additionné de 100 µg/ml d'ampicilline, qui est incubé pendant 16 heures à 37°C afin d'obtenir une culture bactérienne saturée.
3. La préculture est ensuite diluée dans le milieu de culture afin d'atteindre la phase exponentielle de croissance bactérienne et incubée pour un temps et à une température de préinduction donnés dans le Tableau 2.1.
4. L'induction de la production de la protéine recombinante est initiée par l'ajout d'1 mM d'IPTG (Bioshop).

La transcription du gène de la protéine recombinante dont le gène est inséré dans le vecteur pTrcHis est sous contrôle de l'opéron lactose (« lac O ») (voir Figure 2.4). Quand aux gènes des protéines qui sont insérées dans le vecteur pDEST17, c'est un autre système qui est activé par l'IPTG. Ce système nommé système d'expression pET, est basé sur un principe plus complexe. L'hôte, les bactéries Rosetta, possède le gène codant pour la T7 polymérase sous promoteur de l'opéron lactose. Lorsque la T7 polymérase est exprimée par ajout d'IPTG, cette dernière se place sur son site au niveau du vecteur pDEST17, et le gène en aval de ce site sera traduit en protéine recombinante avec l'étiquette His₆ (voir Figure 2.3).

Tableau 2.1 Protocoles d'expression optimum à utiliser pour l'expression de chaque protéine recombinante bactérienne des GAP-His₆

Les plasmides sont nommés en premiers, suivit du nom du gène de la Rho GAP.

Un « X » est indiqué dans la colonne du protocole d'expression ayant donné la meilleure expression de la protéine issue de la traduction d'un recombinant bactérien donné.

Recombinants bactériens	Protocoles d'expression				
	1	3	5	6	8
pDest17-ocrl-1				X	
pDest17-rga-1					X
pDest17-rga-2				X	
pDest17-rga-5		X			
pDest17-rlbp-1					X
pTricHis-cyk-4				X	
pTricHis-gei-1				X	
pTricHis-hum-7					X
pTricHis-pac-1				X	
pTricHis-rga-3	X				
pTricHis-rga-4				X	
pTricHis-rga-7				X	
pTricHis-rga-8				X	
pTricHis-rga-9	X				
pDest17-rga-10			X		
pTricHis-rga-11	X				
pTricHis-rga-13				X	
pTricHis-rrc-1				X	
pTricHis-srgp-1				X	

Tableau 2.2 Protocoles utilisés pour exprimer les protéines recombinantes issues des recombinants bactériens de GAP-His₆

Procédures :	Protocoles d'expression :				
	1	3	5	6	8
Milieu de préculture	LB	LB	LB	LB	LB
Vol. minimal du milieu de préculture (en ml)	25	25	7,1	7,1	1,52
Température de préculture (en °C)	37	37	37	37	37
Temps de préculture(en heures)	16	16	16	16	16
Milieu de culture	TB	TB	TB	TB	M9
Vol. du milieu de culture(en ml)	50	50	50	50	50
Dilution de la préculture	2	2	7	7	33
Température d'induction(en °C)	37	37	37	37	22
Temps de préinduction (en heures)	2	2	2	2	2
[IPTG] (en mM)	1	1	1	1	1
Temps de post-induction(en heures)	1	5	3	5	4

La composition des milieux de culture mentionnés dans le tableau 2.2 est indiquée ci-dessous :

LB : NaCl 10 g/L, Bactopeptone 10 g/L, extrait de levures 5 g/L, NaOH 2 perles/L.

TB (Terrific Broth) : Tryptone 12 g/L, extrait de levures 24 g/L, glycérol 5 g/L.

M9 : 6 g/L Na₂HPO₄ ; 3 g/L KH₂PO₄ ; 1 g/L NH₄Cl ; 0,5 g/L NaCl.

1.3. Lyse des cultures bactériennes des protéines recombinantes

1.3.1. Protocole de lyse enzymatique

GTPases

Les culots de cultures bactériennes ont subi deux cycles successifs de congélation/décongélation à -80°C et à 4°C afin de créer des pores dans les parois bactériennes pour faciliter la lyse.

1. 100 μ l de tampon de lysozyme est ajouté par millilitre de culture bactérienne (50 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 500 μ g/ml lysozyme, 10 μ g/ml d'aprotinine, 10 μ g/ml de leupeptine et 1 mM de PMSF).

Remarque : Le lysozyme est un enzyme qui facilite la lyse cellulaire et l'extraction protéique et le PMSF, la leupeptine et l'aprotinine sont des antiprotéases qui empêchent l'hydrolyse des protéines d'intérêt.

2. Une incubation de 20 min à température pièce sous agitation à 600 rpm permet au lysozyme d'agir et de trois agitations de 10 secondes au vortex pour terminer la lyse mécaniquement.
3. 10 μ l de tampon de nucléase (60 mM CaCl_2 , 150 mM MgCl_2 , 150 mM NaCl, 10 μ g/ml de DNase 1 (Sigma), 100 μ g/ml d'aprotinine, 100 μ g/ml de leupeptine et 10 mM de PMSF) est ajouté par millilitre de culture bactérienne.
4. Une incubation de 15 minutes à température pièce permet d'éliminer les acides nucléiques.
5. 10 μ l de tampon au détergent est ajouté (10 % triton X-100, 50 mM Tris HCl pH 7.4, 150 mM NaCl, 200 mM Imidazole) par millilitre de culture bactérienne et les échantillons sont incubés 30 minutes à 4°C et avec agitation à 600 rpm.

Remarque : Le détergent permet d'extraire les protéines ancrées dans des membranes.

6. Les échantillons sont centrifugés à 4000 rpm pendant 30 minutes puis aliquotés et congelés à -80°C.

GAP

Les culots de cultures bactériennes ont subi deux cycles successifs de congélation/décongélation à -80°C et à 4°C afin de créer des pores dans les parois bactériennes pour faciliter la lyse. Les mêmes étapes et tampons que pour les GTPases ont été utilisés sauf pour le tampon de lysozyme et le tampon au détergent où les 50 mM Tris HCl pH 7.4 ont été remplacés par 50 mM NaH_2PO_4 pH 8.0. En effet, le fabricant (Qiagen) des billes de Ni-Agarose utilisées dans la purification des GAP recommande d'utiliser un tampon phosphate plutôt que du Tris qui peut réduire les ions nickels et donc amoindrir l'interaction entre la GAP et les billes de nickel.

1.3.2. Protocole de lyse par sonication

GTPases

Les culots de 500 ml de culture bactérienne sont resuspendu dans 10 ml de tampon Tris HCl pH 7,4 50 mM, NaCl 50 mM, MgCl₂ 5 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, Leupeptine 10 µg/ml et Aprotinine 10 µg/ml. Les échantillons sont soniqués dans la glace 10 fois 15 sec avec des intervalles de 20 secondes. Les lysats sont récupérés après centrifugation à 4000 rpm pendant 30 min et congelés à -80°C.

GAP

Les culots de 500 ml de culture bactérienne sont resuspendu dans 10 ml de tampon NaH₂PO₄ pH 8,2 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazole 20 mM, DTT 1 mM, PMSF 1 mM, Leupeptine 10 µg/ml et Aprotinine 10 µg/ml. Les échantillons sont soniqués dans la glace 10 fois 15 sec avec des intervalles de 20 secondes. Les lysats sont incubés avec 0.3 % final tween20 pendant 30 minutes à 4°C avec agitation. Les surnageants sont récupérés après centrifugation à 4000 rpm pendant 30 minutes et congelés à -80°C.

1.4. Purification et quantification des protéines

1.4.1. Rho GTPases recombinantes

Les recombinants bactériens des GTPases-GST sont purifiés par chromatographie d'affinité sur des billes de glutathione-sépharose (Gehealthcare) comme décrit précédemment (Self et Hall, 1995). La quantité de GTPases-GST purifié sur les billes de glutathione-sépharose est estimée avec une électrophorèse SDS-PAGE.

1. Tout le liquide dans lequel baigne les billes de glutathione-sépharose est enlevé à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille de 26G 3/8 (Becton Dickinson & co.).

2. Les billes sont resuspendues dans 100 μ l de tampon Laemmli 1X (2X : 120 ml/L SDS 20% ; 300 ml/L Glycérol ; 150 ml/L mercaptoéthanol ; 125 ml/L Tris-HCl pH 6,8 ; 18 mg/L bleu de bromophénol).
3. Préparer le gel SDS-PAGE 10 % d'acrylamide (1,5 mm d'épaisseur) :
Gel de séparation : 3,125 ml d'acrylamide 30 % (Bioshop) ; 4,7 ml de tampon de gel de séparation (1M Tris-HCl pH 8,8) ; 125 μ L de SDS 10 % ; 2 ml de saccharose 50 % ; 2,3 ml d'eau ; 3,13 μ L de TEMED et 313 μ L d'ammonium persulfate.
Gel d'entassement : 500 μ L d'acrylamide 30 % ; 2,1 mL de tampon de gel d'entassement (0,375 M Tris-HCl pH 6,8) ; 62,5 μ L de SDS 10 % ; 3,15 mL d'eau ; 2,5 μ L de TEMED et 500 μ L d'ammonium persulfate (50 mg/ml d'eau).
4. Les échantillons sont chargés sur le gel d'acrylamide à 10 % avec un standard de faible poids moléculaires pour protéines (BioRad) et une échelle de concentration de BSA (1 ; 5 ; 10 μ g).
5. L'électrophorèse est faite à 125 Volts constants et 60 mA dans du tampon d'électrophorèse SDS PAGE (Tris 2,9g/L ; glycine 14,4g/L ; SDS 1g/L).
6. La coloration au bleu de Coomassie (2,5 g/L brillant bleu ; 400 ml méthanol/L ; 70 ml acide acétique glacial/L) du gel pendant 1 heure suivi de la décoloration (400 ml méthanol/L ; 70 ml acide acétique glacial/L) pendant 1 heure permet ensuite de quantifier la concentration de GTPases purifiées.

1.4.2. Rho GAP recombinantes

La purification des Rho GAP recombinantes sur billes de Ni-Agarose nous permettra de connaître leur poids moléculaire. L'échantillon purifié de chaque Rho GAP est chargé sur un gel SDS PAGE 12 % d'acrylamide à côté de son lysat. La concentration de GAP dans le lysat est alors quantifiée en repérant la bande au même poids moléculaire que la protéine dans l'échantillon purifié aux environs de 30 kDa. Lors de l'essai de liaison avec les GTPases, la quantité de lysat correspondant à 2 μ g de GAP sera mis en présence de 1,25 μ g de GTPases purifiées sur les billes de glutathione-sépharose.

1. Les recombinants bactériens des GAP-His₆ sont purifiés sur des billes de Ni-Agarose (Qiagen) pendant 1 h à 4 °C.

2. Les billes sont lavées avec un tampon de 50 mM NaH₂P0₄ pH 8; 300 mM NaCl, 20 mM Imidazole.
3. Tout le liquide est enlevé à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille de 26G 3/8.
4. Les billes sont resuspendu dans 100 µl de tampon Tris-HCl pH 7,5 20 mM et DTT 0,1 mM.
5. Préparer le gel SDS-PAGE 12 % d'acrylamide (1,5 mm d'épaisseur) :
Gel de séparation : 3,75 ml d'acrylamide 30 % ; 4,7 ml de tampon de gel de séparation ; 125 µL de SDS 10 % ; 2 ml de saccharose 50 % ; 1,65 ml d'eau ; 3,13 µL de TEMED et 313 µL d'ammonium persulfate.
Gel d'entassement : 500 µL d'acrylamide 30 % ; 2,1 mL de tampon de gel d'entassement ; 62,5 µL de SDS 10 % ; 3,15 mL d'eau ; 2,5 µL de TEMED et 500 µL d'ammonium persulfate.
6. Les échantillons purifiés sont chargés à côté de leur lysat sur le gel d'acrylamide à 12 % avec un standard de faible poids moléculaires pour protéines (BioRad) et une échelle de concentration de BSA (1 ; 2 ; 5 µg).
7. Faire une électrophorèse à 120 Volts constants et 60 mA sur gel SDS-PAGE 12 % acrylamide dans un tampon d'électrophorèse (Tris 2,9 g/L ; glycine 14,4 g/L ; SDS 1g/L).
8. La coloration au bleu de Coomassie du gel pendant 1 heure suivi de la décoloration pendant 1 heure permet ensuite de quantifier la concentration de GAP dans le lysat.
9. La quantité de GAP-His₆ dans le lysat est estimée comme pour les GTPases recombinantes.

1.5. Essai de fixation *in vitro* des GAP sur les GTPases

1. La quantité de billes correspondant à 5 µg de GTPases est resuspendue dans 50 µl de tampon de fixation (20 mM Tris HCl pH 7,5 ; 25 mM NaCl ; 0,1 mM DTT).
2. À cela est ajouté 5 mM final d'EDTA et 400 µM de GTP[γ-S] (Sigma).
3. Le chargement du nucléotide est fait à 30°C et arrêté après 10 minutes sur glace par ajout de 30 mM final de MgCl₂.

4. 1,25 µg de GTPases chargées de leur GTP[γ-S] est additionné d'une quantité de lysat contenant 2 µg de GAP (dilué si nécessaire dans le tampon de lyse suivant : NaH₂PO₄ pH8 50 mM, NaCl 300 mM, Imidazole 20 mM), et la concentration de GTP[γ-S] est ajustée pour obtenir une concentration finale de 100 µM.
5. La fixation des GAP sur les GTPases se fait à 4°C pendant 1 h avec une agitation douce toutes les 15 minutes. Les complexes formés sont lavés 3 fois dans du tampon de lavage (20 mM Tris HCl pH 7.5, 100 mM NaCl, 20 mM MgCl₂ et 0,1 mM DTT).
6. Tout le liquide est enlevé à l'aide d'une aiguille de 26G 3/8. Les billes sont resuspendues dans 60 µl de tampon laemmli et 30 µl sont chargés sur un gel SDS-PAGE à 12 % d'acrylamide.

Le protocole a été amélioré pour augmenter la spécificité des interactions des GTPases avec les GAP en ajoutant de la BSA à une concentration finale de 1 µg/µl dans le mélange contenant 1,25 µg de GTPases chargées de leur GTP[γ-S] et la quantité de lysat correspondant à 2 µg de GAP.

1.6. Électrophorèse en gel SDS PAGE et immunobuvardage

Les échantillons d'essai de fixation *in vitro* des GAP sur les GTPases obtenus sont séparés par électrophorèse SDS-PAGE sur un gel de polyacrylamide de 12 %.

1. Préparer le gel SDS-PAGE 12 % d'acrylamide (1,5 mm d'épaisseur) :
Gel de séparation : 3,75 ml d'acrylamide 30 % ; 4,7 ml de tampon de gel de séparation ; 125 µL de SDS 10 % ; 2 ml de saccharose 50 % ; 1,65 ml d'eau ; 3,13 µL de TEMED et 313 µL d'ammonium persulfate.
Gel d'entassement : 500 µL d'acrylamide 30 % ; 2,1 mL de tampon de gel d'entassement ; 62,5 µL de SDS 10 % ; 3,15 mL d'eau ; 2,5 µL de TEMED et 500 µL d'ammonium persulfate.
2. Faire une électrophorèse à 120 Volts constants et 60 mA suivit d'un transfert dans un tampon de transfert (glycine 2,9 g/L ; Tris 5,8 g/L ; SDS 0,37 g/L ; Méthanol 20 %) pendant 1 heure à 100 Volts constants sur une membrane de nitrocellulose 0,45 µm (Biorad).

3. Incuber la membrane 1 heure dans la solution de blocage (PBS 0,1 % Tween20, 5 % lait).
Note : PBS 10 X : 80 g/L NaCl ; 2 g/L KCl ; 11,5 g/L Na₂HPO₄.7H₂O ; 2 g/L KH₂PO₄.
4. Les membranes sont incubées 1 heure dans une solution de PBS 0,1 % Tween20, 1 % lait contenant 1/5000 de la sonde Ni couplée à l'enzyme HRP (His detector Ni-HRP, KPL) spécifique de l'étiquette His₆.
5. Les membranes sont lavées 4 fois 15 minutes dans du PBS 0,1 % Tween20.
6. Un film photographique (HyBlot CL Premium 8x10 in., Denville Scientific Inc.) est exposé 10 minutes avec les membranes pré-incubées une minute dans le luminol (Lightening Chemiluminescence reagent plus, Perkin).
7. La fixation de la GAP sur la GTPase est évaluée en comparaison avec une quantité donnée de lysat contenant approximativement 0,2 µg de GAP non purifiée.

2. Résultats

2.1. Purification et quantification des protéines

2.1.1. Rho GTPases recombinantes

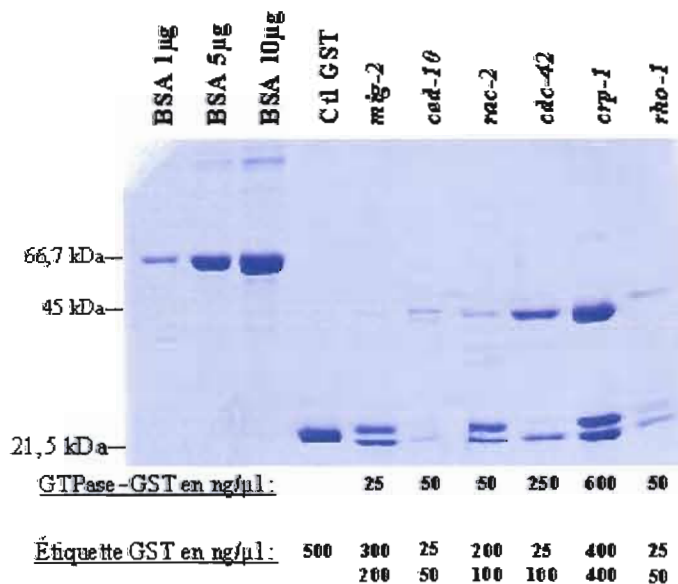


Figure 2.5 Gel d'électrophorèse SDS PAGE des Rho GTPases-GST purifiées sur billes de glutathione sépharose

Après 1 heure de purification à 4°C des GTPases et de l'étiquette contrôle GST (Ctl GST) sur billes de glutathione sépharose, les billes ont été lavées et 10 % de chaque échantillon ont été chargés sur un gel SDS PAGE de 10 % d'acrylamide avec une gamme de trois concentrations de BSA (1, 5 et 10 µg). Le gel a été coloré au bleu de Coomassie pour permettre une quantification approximative des GTPases purifiées grâce aux quantités connues de BSA. La quantité de GST issue de la dégradation des GTPases-GST est également quantifiée.

Dans le 4^{ème} puit la GST seule a migré à environ 26 kDa. On observe deux produits de dégradation des protéines de fusion à deux sites proches l'un de l'autre autour de 26 kDa. La bande de plus haut poids moléculaire ne peut pas être la GTPase sans son étiquette GST, puisque seules les protéines portant l'étiquette GST restent accrochées sur les billes de glutathione sépharose lors des lavages. Donc la GTPase sans étiquette GST ne serait pas retenue sur les billes. L'un des sites de protéolyse de la protéine de fusion se situe vers la partie N-terminale de la GTPase et correspond à la bande la plus haute du doublet tandis que

l'autre site se situe dans la partie C-terminale de la GST et correspond à la bande la plus basse. La succès de la purification des protéines de fusion est fonction de la quantité de la protéine de fusion purifiée d'une part et de la quantité de ces produits de dégradation.

La purification de *mig-2*-GST a été très pauvre en raison d'une grande quantité de produits de dégradation vers 26 kDa et de la très petite quantité de la protéine de fusion (25 ng/μl) à 45 kDa. Il en est de même pour *rac-2*-GST qui a été purifiée à 50 ng/μl. *ced-10*-GST et *rho-1*-GST ont également été purifiée en faible quantité (50 ng/μl) mais on observe peu de produits de dégradation vers 26 kDa. *cdc-42*-GST et *crp-1*-GST ont donné les meilleures purifications de protéine de fusion (respectivement 250 et 600 ng/μl) par rapport aux produits de dégradations.

Le volume de billes correspondant à 5 μg de GTPases sera utilisé pour les essais de fixation avec les GAP (voir Figure 2.7).

2.1.2. Rho GAP recombinantes

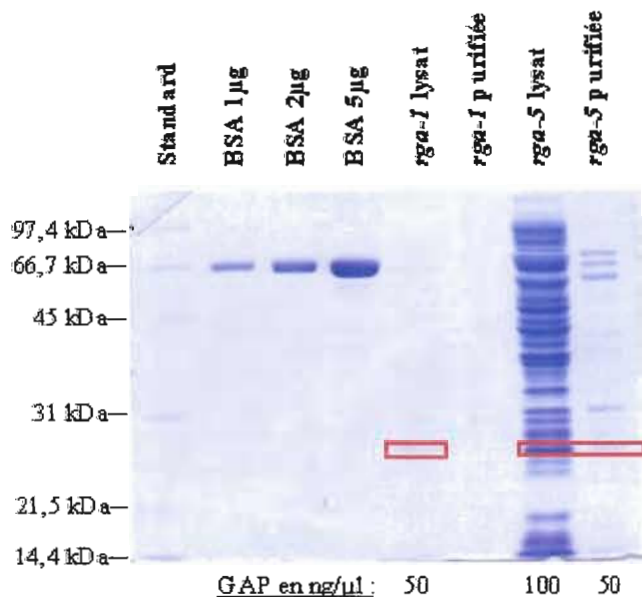


Figure 2.6 Gel d'électrophorèse SDS PAGE des Rho GAP-His₆ purifiées sur billes de Ni-Agarose

Les GAP-His₆ sont purifiées pendant 1 heure à 4°C sur des billes de Ni-Agarose. Puis les échantillons de lysats et les échantillons purifiés des GAP *rga-1* et *rga-5* sont chargés sur un gel SDS PAGE à 12 % d'acrylamide avec une gamme de trois concentrations de BSA (1, 2 et 5 µg). Après électrophorèse, le gel est coloré au bleu de Coomassie et la concentration des GAP est évaluée grâce aux quantités connues de BSA.

La purification des lysats de GAP sur les billes de Ni-Agarose a servi à localiser la GAP sur le gel SDS PAGE. Dans le cas de *rga-1*, elle est assez pure dans le lysat puisqu'on ne distingue qu'une protéine (encadrée en rouge). Et nous n'avons pas réussi à la purifier car elle était déjà en faible quantité dans le lysat. Nous avons évalué la concentration de *rga-1* à 50 ng/µl de lysat. À l'inverse de *rga-1*, *rga-5* se trouve mélangée avec une grande quantité de protéines bactériennes dans le lysat. Sa purification permet de distinguer une protéine à 31 kDa à 50 ng/µl, et de déduire la concentration de *rga-5* dans le lysat à 100 ng/µl (voir cadre rouge Figure 2.6).

2.2. Essai de fixation *in vitro* des GAP sur les GTPases

Les protéines recombinantes lysées avec la méthode enzymatique n'ont pas donné de résultat lors de l'essai de fixation des Rho GAP sur les Rho GTPases. Nous avons donc changé de protocole de lyse par méthode enzymatique pour une lyse par sonication. Les essais de liaisons par cette méthode n'ont pas plus donné de résultats. Nous avons donc recherché dans la littérature si notre protocole de fixation des GAP avec les GTPases était complet. Nous avons trouvé dans la littérature qu'il faut ajouter de la BSA dans le mélange contenant la GAP et la GTPase chargée de son nucléotide afin de masquer les sites non spécifiques à la GAP, afin qu'elle se fixe spécifiquement à la GTPase (Jenna *et al.*, 2002). Nous avons donc obtenu les résultats suivants :

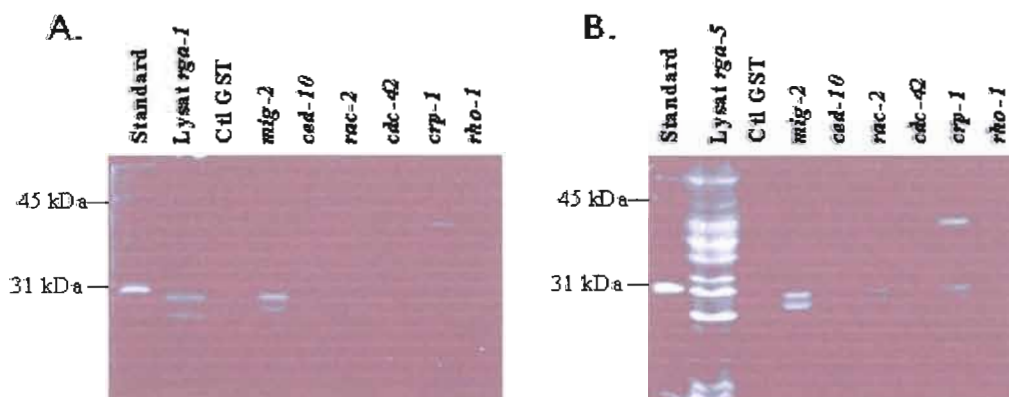


Figure 2.7 Photographies des membranes de nitrocellulose des essais de liaisons de A. *rga-1* et B. *rga-5* avec toutes les Rho GTPases de *C. elegans*

Dans l'ordre des puits de gauche à droite : les standards de faibles poids moléculaires de protéines, le lysat en A. de *rga-1* ou en B. de *rga-5* et les GTPases : *mig-2* (C35C5.4), *ced-10* (C09G12.8b), *rac-2* (K03D3.10b), *cdc-42* (R07G3.1), *crp-1* (Y32F6B.3) et *rho-1* (Y51H4A.3).

Nous pouvons constater que la sonde Ni-HRP n'est pas très spécifique aux étiquettes His₆ de la GAP car nous pouvons voir deux à trois protéines par puit. Une protéine à environ 45 kDa est observable dans le puits de *crp-1* sur les deux membranes, elle correspond à la fusion GST-GTPase et à ses produits de dégradation (voir Figure 2.7). L'immunoblot du

lysats de *rga-1* avec la sonde Ni-HRP est assez propre car il ne permet la détection que de deux bandes : la GAP à 30 kDa et une autre protéine à environ 27 kDa (voir Figure 2.7 A.). Le lysat de *rga-5*, quant à lui est composé de nombreuses protéines de tous poids moléculaires que la sonde Ni-HRP est capable de détecter. D'autre part, *rga-5* s'observe bien à 30 kDa (voir Figure 2.7 B.).

Les produits de dégradation de la fusion GST-GTPase très abondants pour certaines GTPases comme *mig-2*, *ced-10* et *crp-1* ne permettent pas à la sonde Ni-HRP de détecter la GAP migrant à la même taille (voir Figure 2.7).

3. Conclusions

Nous pensons que la méthode de lyse enzymatique dénature la GTPase à cause de la chaleur, en effet la lyse enzymatique était faite à température pièce. D'autre part, l'EDTA semble aussi jouer un rôle défavorable dans le maintien de la structure tridimensionnelle de la GTPase, puisque c'est un chélateur d'anions, et la fixation du nucléotide à la GTPase nécessite deux ions Mg^{2+} , et cette fixation est nécessaire au maintien de la structure 3D de la GTPase. On pourrait penser que la grande quantité de $MgCl$ (150 mM) contenue dans le tampon de nucléase et celle de $NaCl$ (150 mM) contenue dans tous les tampons du protocole, auraient pu empêcher la dénaturation de la GTPase, mais cela ne semble pas être le cas.

Nous avons fait un certain nombre de changements au protocole permettant d'obtenir une GTPase plus active (utilisation d'un protocole de sonication au lieu du protocole de lyse enzymatique). Nous avons de plus tenté de réduire la fixation non spécifique des GTPases sur les GAP en saturant notre milieu de liaison avec de la BSA. Il nous reste à régler un problème de spécificité de détection des protéines GAP par la sonde Ni-HRP. Nous avons tenté d'améliorer le blocage des membranes en augmentant le pourcentage de lait sans succès. Nous pourrions essayer de bloquer les membranes dans la BSA, comme le fabricant de Ni-HRP le conseille.

TROISIÈME PARTIE

Étude des interactions génétiques entre les Rho GAP au cours du développement embryonnaire de *C. elegans in vivo*

Cette partie est le deuxième volet de ce projet, qui vise à étudier les interactions fonctionnelles des Rho GAP au cours du développement embryonnaire du *C. elegans in vivo*. Pour cela, une méthode classique a tout d'abord été utilisée. Dans un deuxième temps, une méthode à haut débit a été mise au point (voir quatrième partie) afin de répondre à la grande quantité d'essais à effectuer pour étudier toutes les interactions génétiques possible des Rho GAP entre elles.

CHAPITRE 1

Matériels et Méthodes

1. Préparation du matériel bactériologique destiné au traitement ARNi

Les constructions des plasmides pDONR-Rho GAP de *C. elegans* ont toutes été fournies par la Dre S. Jenna (Figure 1.1). En utilisant la technologie Gateway (Invitrogen) (voir le principe dans la section 1.1.1 du chapitre 2 de la deuxième partie), les gènes des GAP ont été recombinaés dans un vecteur pL4440-DEST (voir Figure 1.2) et transformés dans les bactéries DH5 α compétentes.

La mise en culture de ces recombinants bactériens (DH5 α -pL4440-DEST-Rho GAP) ont permis la production d'une grande quantité de vecteurs recombinés. La purification de ces vecteurs s'est faite sur colonne miniprep (Qiagen).

Après vérification de la présence du vecteur recombiné par électrophorèse sur gel d'agarose, chaque échantillon de vecteur pL4440-DEST-Rho GAP a été transformé dans les bactéries HT115 compétentes. Ces bactéries possèdent le gène de la T7 polymérase sous contrôle de l'opéron lactose qui est activé par la présence d'IPTG dans le milieu de culture. La T7 polymérase se place alors sur son site spécifique en amont du gène d'intérêt pour produire un ARN interférent double brin (dsARNi). D'autre part, les HT115 sont déficientes en RNase, ce qui permet le maintien d'une grande quantité d'ARNi dans la bactérie (Kamath *et al.*, 2003). Une vérification de l'introduction du vecteur recombiné dans les HT115 est effectué par PCR et séquençage.

Comments for:

	pDONR™201
	4470 nucleotides
<i>rmb</i> T2 transcription termination sequence (c):	73-100
<i>rmb</i> T1 transcription termination sequence (c):	232-275
Recommended forward priming site:	300-324
<i>attP1</i> :	332-563
<i>ccdB</i> gene (c):	959-1264
Chloramphenicol resistance gene (c):	1606-2265
<i>attP2</i> (c):	2513-2744
Recommended reverse priming site:	2769-2792
Kanamycin resistance gene:	2868-3677
Gentamicin resistance gene (c):	--
pUC origin:	3794-4467
(c) = complementary strand	

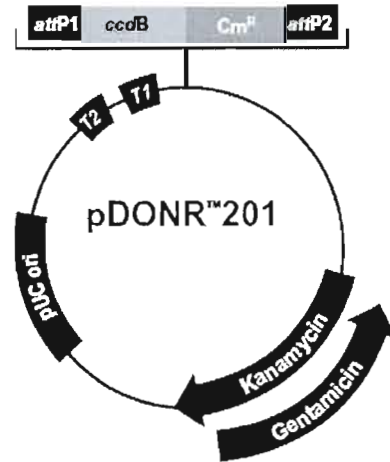


Figure 1.1 Vecteur d'entrée pDONR™201 (Invitrogen™)

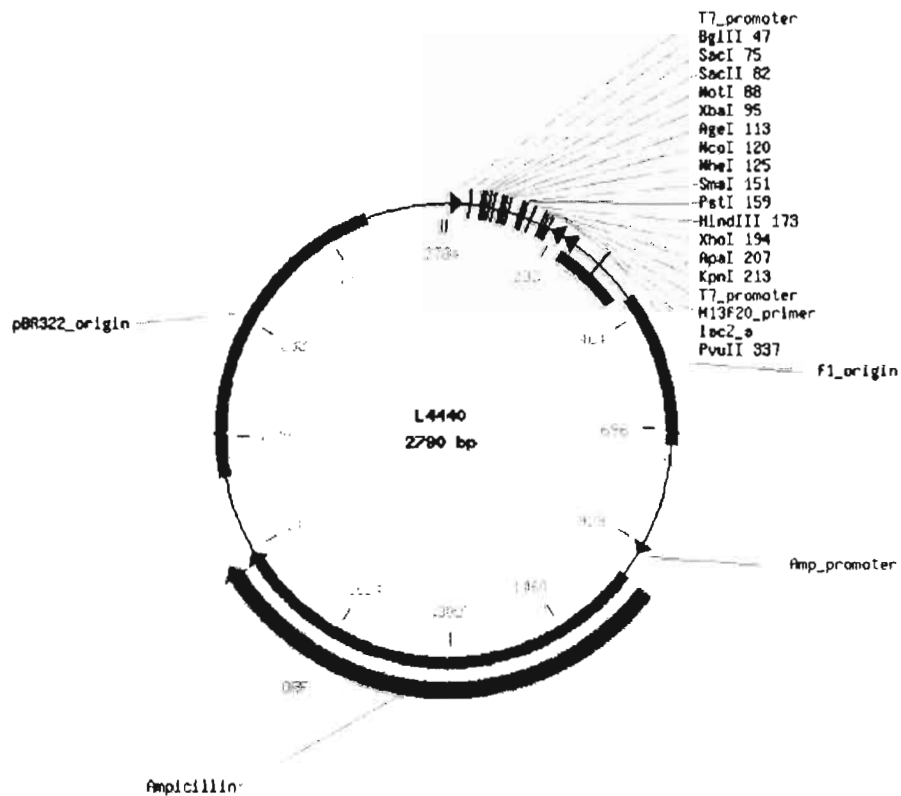


Figure 1.2 Vecteur d'expression pL4440-DEST (Invitrogen™)

1.1. Clonage dans le vecteur pL4440

Le mélange pour la réaction LR est effectué comme suit pour un volume total de 5 μ l par échantillon :

- 1 μ l de pDONR-GAP à 50 ng/ μ l
- 1 μ l tampon de réaction LR 5X (Invitrogen)
- 1 μ l pL4440 vide à 75 ng/ μ l (Invitrogen)
- 0,5 μ l LR clonase (Invitrogen)
- 1,5 μ l TE (10 mM Tris pH 8 ; 1 mM EDTA)

Centrifuger à 450 rpm 2 min et laisser à température pièce toute une nuit.

1. Arrêter la réaction en ajoutant 0,5 μ l de protéinase K (Invitrogen) pour terminer la réaction
2. Incuber à 37°C pendant 10 minutes
3. Conserver à -20°C ou faire directement la transformation bactérienne dans les DH5 α compétentes

1.2. Transformation du pL4440-Rho GAP dans les DH5 α

1. Dégeler les bactéries compétentes *E. coli* DH5 α sur la glace.
2. Transférer 1 μ L d'ADN pur dans un tube 1,5 ml stérile contenant 50 μ L bactéries compétentes.
3. Incuber sur la glace pendant 30 min.
4. Préparer des Pétri (Sarstedt) de 6 cm de diamètre stériles avec du LB agar (NaCl 10 g/L, Bactopeptone 10 g/L, extrait de levures 5 g/L, 2 perles/L NaOH et agar 10 g/L) additionné de 100 μ g/ml d'ampicilline.
5. Faire un choc-thermique au mélange bactéries/plasmides à 42°C pendant 90 sec.
6. Remettre les bactéries sur la glace pendant 10 min.
7. Ajouter 300 μ L de milieu LB (NaCl 10 g/L, Bactopeptone 10 g/L, extrait de levures 5 g/L et 2 perles/L NaOH).
8. Faire agiter les tubes à 37°C pendant 30 minutes.

9. Transférer 100 μ l de la culture sur un Pétri de LB agar additionné de 100 μ g/ml d'ampicilline.
10. Étaler la culture avec un instrument stérile.
11. Incuber les Pétris à 37°C retournés toute une nuit.
12. Mettre en culture une colonie isolée résistante à l'ampicilline dans 5 ml de LB
13. Incuber à 37°C pendant 16 heures.
14. Purifier les plasmides à partir de cette culture avec le kit QIAprep Spin Miniprep (voir section ci-dessous de ce chapitre).

1.3. Purification des pL4440-Rho GAP à partir de cultures de DH5 α et électrophorèse sur gel d'agarose

Les plasmides recombinés sont purifiés comme décrit précédemment avec le kit QIAprep Spin Miniprep de Qiagen (Birnboim, 1983).

Les échantillons sont préparés comme suit pour l'électrophorèse :

- 1 μ l de tampon de chargement d'électrophorèse d'ADN 10X (0,2 % bleu de bromophénol ; 0,2 % xylène cyanol ; 0,2 M EDTA pH 8 ; 50 % glycérol),
- 2 μ l de plasmides recombinés et purifiés,
- 7 μ l d'eau sans RNase pour un total de 10 μ l.

Ils sont ensuite chargés avec un standard d'ADN Lambda (λ) Hind III (Bioshop) sur un gel d'agarose 1 % (Bioshop) fondu dans du tampon TAE (Tris-acide acétique pH 8,5 ; 2 mM Na₂EDTA.2H₂O) et contenant 0,001 mg/ml de Bromure d'éthidium (Bioshop). L'électrophorèse est faite dans du tampon TAE à 100 Volts constants. Le gel est exposé aux UV et une photographie est prise avec le système d'imagerie pour l'analyse de la qualité des plasmides et l'estimation approximative de leur concentration.

1.4. PCR sur les plasmides pL4440-Rho GAP purifiés à partir de cultures de DH5 α

1. La mesure précise de la concentration des plasmides purifiés est faite sur l'appareil NanoDrop 2000 (Thermo Scientifique).
2. Le mélange réactionnel de PCR est préparé comme suit :
 - a. 0,4 μ l de DNTP 10 mM (100 mM dATP, 100 mM dCTP, 100 mM dTTP et 100 mM dGTP ; Invitrogen)
 - b. 0,4 μ l de mélange d'amorces 20 μ M (1 μ l d'amorce pL4440-dest-RNAi-FOR (5' GTTTTCCCAGTCACGACGTT 3') ; 1 μ l d'amorce pL4440-dest-RNAi-REV (5'TGGATAACCGTATTACCGCC 3') ; 8 μ l d'eau)
 - c. 2 μ l de tampon de PCR 10X (Qiagen)
 - d. 0,6 μ l de pTaq polymérase maison
 - e. 2 μ l d'ADN (50 ng de plasmides purifiés)
 - f. 14,6 μ l d'eau sans DNase ni RNase
3. Programmer le thermocycleur à PCR (Applied Biosystems 2720)
 - (1) Dénaturation initiale à 94°C pendant 3 minutes
Ajouter 0,6 μ L de Taq polymérase
 - (2) Dénaturation à 94°C pendant 45 secondes
 - (3) Hybridation à 60°C pendant 30 secondes
 - (4) Élongation à 72°C 1 minute/kpb
Nombre de cycles, étapes (2) à (4) : 35
 - (5) Élongation finale à 72°C pendant 5 minutes
4. Les différents échantillons de PCR sont additionnés de 2 μ L de tampon de chargement d'électrophorèse d'ADN 10X et sont soumis à une électrophorèse sur gel d'agarose 1 % en présence de 0,001 mg/ml bromure d'éthidium avec pour standard 0,5-10 kpb (Bioshop). Une photographie du gel exposé aux U.V. a été faite sur le système d'imagerie Alpha Innotech Corporation (appareil photo avec exposition aux U.V.) pour visualiser la présence des plasmides et leur poids moléculaire.

1.5. Séquençage sur les plasmides pL4440-Rho GAP purifiés à partir de cultures de DH5 α

La mesure précise de la concentration des plasmides purifiés est faite sur l'appareil NanoDrop 2000 (Thermo Scientific). Il est nécessaire d'avoir une concentration entre 100 et 500 ng/ μ L.

Le séquençage a été fait sur les plasmides purifiés à partir des cultures de DH5 α -pL4440-Rho GAP. Les échantillons ont été envoyés avec l'amorce pL4440-dest-RNAi-FOR (5' GTTTTCCCAGTCACGACGTT 3') au centre Génome Québec (Université McGill).

Les séquences ADN et protéiques de chaque GAP ont été obtenues sur www.wormbase.org et <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>. Les domaines GAP ont été retrouvés sur le site <http://smart.embl-heidelberg.de/>.

Les séquences obtenues par séquençage des plasmides auprès du centre Génome Québec doivent être comparées avec les séquences connues du *C. elegans*. Les comparaisons de ces séquences ont été faites sur le site <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Le programme utilisé s'appelle « nucleotide blast », il cherche une base de données de nucléotides en utilisant une requête de nucléotides (celle obtenue au séquençage). La base de données utilisée est une collection de nucléotides (nr/nt) et l'organisme choisi est le *Caenorhabditis elegans*. Les résultats donnent un pourcentage d'identité entre la séquence de requête (« query ») et la séquence de la base de données (« subject »).

1.6. Génération des clones bactériens destinés aux traitements ARNi

1.6.1. Transformation du pL4440-Rho GAP dans les HT115

Les plasmides recombinés et purifiés sont transformés dans la souche bactérienne *E. coli* HT115(DE3) comme décrit précédemment (Kamath *et al.*, 2003).

Voir la section 1.2 de ce chapitre.

1.6.2. Vérification de la transformation des HT115 par les pL4440-Rho GAP

1.6.2.1. Par électrophorèse des plasmides purifiés

1. Les recombinants bactériens HT115 des pL4440-Rho GAP ont été mis en culture pendant 16 heures à 37°C sur LB agar additionné de 100 µg/ml d'ampicilline et de 12,5 µg/ml de tétracycline (préparée à 5 mg/ml dans l'éthanol 95 % et conservée à -20°C ; Bioshop).
2. Une colonie est alors piquée et diluée dans 4 à 10 ml de milieu LB.
3. Les cultures sont incubées pendant 16 heures à 37°C et à 220 rpm.
4. Les plasmides recombinés sont purifiés comme décrit précédemment avec le kit QIAprep Spin Miniprep à partir des cultures précédentes (Birnboim, 1983).
5. 2 µl des plasmides purifiés sont chargés sur un gel d'agarose pour une électrophorèse (voir la section 1.3)

1.6.2.2. Par PCR

Voir la section 1.4 de ce chapitre.

2. Traitements ARNi en milieu solide contre les Rho GAP sur les vers mutants et sauvages

Chaque traitement avec des ARNi est fait en triplicata, et chaque plaque de 24 puits contient un contrôle négatif : les vers sont nourris d'HT115(DE3) sans plasmides pL4440 ; et un contrôle positif : les vers sont nourris d'HT115(DE3) transformées avec le vecteur pL4440-eGFP. Voir la section 3.1 quatrième partie, chapitre 1, pour le principe du traitement ARNi par nutrition (RNAi through feeding the animals with bacteria expressing the dsRNA).

2.1. Souches de vers *C. elegans* utilisées

Les souches ont été obtenues chez CGC. N2, souche sauvage et les souches mutantes pour 12 Rho GAP (voir Tableau 1.1).

Tableau 1.1 Mutants existants pour les Rho GAP chez *C. elegans*

ND : non disponible

Rho GAP	Souches	Génotype	Outcross
<i>cyk-4</i>	VC859	+/mT1 II; <i>cyk-4(ok1034)/mT1[dpy-10(e128)]</i> III.	1x
<i>gei-1</i>	ND		
<i>hum-7</i>	ND		
<i>ocrl-1</i>	ND		
<i>pac-1</i>	RB1616	C04D8.1(ok1988) III.	0x
<i>rga-1</i>	RB1430	<i>klp-17&rga-1(ok1630)</i> II.	0x
<i>rga-2</i>	ND		
<i>rga-3</i>	VC1437	K09H11.3(ok1889) V.	0x
<i>rga-4</i>	RB1582	Y75B7AL.4(ok1935) V.	0x
<i>rga-5</i>	RB1247	ZK669.1a(ok1311) II.	0x
	RB1353	ZK669.1a(ok1498) II.	0x
	VC992	<i>tag-341(ok1498)</i> II.	0x
<i>rga-7</i>	RB1252	C01F4.2(ok1316) I.	0x
<i>rga-8</i>	ND		
<i>rga-9</i>	VC808	<i>tag-325(ok1330)</i> III.	0x
<i>rga-10</i>	ND		
<i>rga-11</i>	ND		
<i>rga-12</i>	RB1751	H08M01.2(ok2241) IV.	0x
<i>rga-13</i>	ND		
<i>rlbp-1</i>	ND		
<i>rrc-1</i>	RB1490	F47A4.3(ok1747) X.	0x
<i>srgp-1</i>	VC202	<i>srgp-1(ok300)</i> IV.	0x
<i>syd-1</i>	CZ1893	<i>syd-1(ju82)</i> II.	x>2
	RB1389	F35D2.5(ok1578) II.	0x

2.2. Synchronisation de la population de nématodes

Grâce à leurs coquilles, les œufs sont capables de résister à un traitement de 8 minutes dans l'hypochlorite, contrairement aux larves et adultes qui ne sont protégés que par une cuticule. Ce traitement à l'hypochlorite, sert donc à synchroniser une population à majorité adulte en 16 heures :

1. Les vers sont mis en suspension avec du tampon M9² à partir de 2 plaques de NGM agar³ contenant une majorité d'adultes en train de pondre.
2. Les nématodes sont sédimentés dans un tube de 1,5 ml à 900 g à température pièce.
3. Ils sont ensuite mis en présence de 1 ml de tampon hypochlorite (0,4 M Hypochlorite ; 0,5 M NaOH) pendant 4 minutes, et lavés 5 fois puis resuspendus dans 500 µl de tampon M9 stérile.
4. Les embryons sont incubés 16 heures à 22°C sous agitation (220 rpm sur un agitateur orbital). Pendant cette incubation les œufs vont éclore en larves L1 qui vont rester à ce stade par manque de nourriture.

2.3. Induction de la synthèse d'ARN double brins par les clones bactériens HT115

1. Les clones bactériens HT115 (contenant les pL4440-Rho GAP ; le pL4440-Cdc42, et pL4440-eGFP) sont fraîchement striés sur milieux LB agar additionné de tétracycline 12,5 µg/ml et d'ampicilline 100 µg/ml ; et incubés à 37°C pendant 16 heures.
2. Une colonie isolée de chaque clone bactérien est mise en culture à 37°C et 220 rpm pendant 16 heures dans 2 ml de milieu LB additionné de tétracycline 12,5 µg/ml et d'ampicilline 100 µg/ml.
3. Après dilution 35 fois de la culture de 16 heures dans 2 ml de LB additionné d'ampicilline 100 µg/ml, la culture est incubée à 37°C 220 rpm pendant 3 heures (qui correspond à une D. O. de 0,8).
4. 10 µl de la culture obtenue est ajoutée dans des plaques de 24 puits contenant du milieu NGM agar additionné d'ampicilline 100 µg/ml et de 6 mM final d'IPTG afin d'induire la production d'ARN double brins.
5. Les plaques de 24 puits sont mises à sécher à température pièce pendant 16 heures.

²Composition du tampon M9 : 12,8 g/L Na₂HPO₄.7H₂O ; 3 g/L KH₂PO₄ ; 5 g/L NaCl ; 0,25 g/L MgSO₄.7H₂O

³Composition du milieu NGM-agar : 3 g/L NaCl ; 16 g/L Agar ; 2,5 g/L Bactopeptone ; autoclaver et ajouter 1 mM MgSO₄ ; 1 mM CaCl₂ ; 5 µg/ml cholestérol et 1 mM tampon phosphate (1M : 129,25 g/L KH₂PO₄ ; 51,75 g/L K₂HPO₄ ; ajuster le pH à 6 et filtrer pour stériliser).

2.4. Traitement des animaux synchronisés aux ARNi

1. Les larves L1 obtenus de la synchronisation sont comptés pour connaître leur concentration par μl de M9 sous un microscope à dissection (Leica MS5).
2. Entre 15 et 20 vers L1 synchronisés de chaque souche sont ajoutés par puit dans des plaques de 24 puits stériles avec couvercle (Corning).
3. Les plaques sont retournées et incubées 72 heures à 18°C.

2.5. Analyse du phénotype de létalité embryonnaire

Après trois jours de traitement aux ARNi à 18°C, les L1 sont devenus des adultes qui pondent des œufs. Il est alors possible de faire l'analyse du phénotype de létalité embryonnaire de leur progénie en seulement deux jours.

2.5.1. Observation du développement embryonnaire de *C. elegans* en 4D

1. Les vers adultes traités aux ARNi sont déposés dans un verre de montre contenant du M9.
2. Ils sont disséqués sous un microscope à dissection (Leica MS5) par le milieu avec des aiguilles fines 30G ½ (Becton Dickinson & co.) afin de faire sortir leurs œufs.
3. Puis ils sont délicatement déposés sur une couche d'agar (4% d'agar bactériologique (Bioshop) dans du M9) monté entre une lame (Premiere®) et une lamelle (Fisher).
4. La lamelle est scellée avec du vernis transparent pour empêcher la déshydratation des œufs. Les œufs sont ensuite repérés sur le microscope à fluorescence (Leica DM 5500B, camera Leica DF C350 FX).
5. Le logiciel Leica LAS AF est programmé pour prendre des photos toutes les 2 minutes dans l'épaisseur de l'œuf à intervalles de 4 μm (épaisseur d'un noyau de cellule).

2.5.2. Test de létalité embryonnaire

2.5.2.1. Calcul du test de létalité embryonnaire

Lorsque les vers adultes ont pondu entre 100 et 200 œufs, ils sont lavés avec du tampon M9 et une photo des œufs dans le puits est prise sous le microscope à dissection pour plaques (Leica MZ16F) munie d'une caméra (DFC290) avec le logiciel « Leica Applications suite ». 24 heures plus tard, une deuxième photo du puit est faite. Le comptage du nombre d'œufs sur les deux photos permettra de calculer le pourcentage de létalité embryonnaire (% Let. Emb.) en utilisant l'équation suivante :

Equation 1.1

$$\% \text{ Let. Emb.} = \frac{\text{nombre œufs J2} \cdot 100}{\text{nombre œufs J1}}$$

Le compte du nombre d'œufs le premier jour « nombre œufs J1 » correspond au nombre total d'œufs pondus. Tandis que le compte du deuxième jour « nombre œufs J2 » correspond au nombre d'œufs morts qui n'ont pas éclot en larve L1.

2.5.2.2. Analyse du test de létalité embryonnaire

Il existe quatre types de mutations :

- les hypermorphes (augmentation de fonction),
- les hypomorphes (réduction de fonction),
- les nuls/amorphes (perte de fonction totale),
- et les néomorphes (nouvelle fonction).

La découverte des ARN interférents a facilité les outils d'étude en génétique. En effet les ARNi sont des outils simples et efficaces pour diminuer l'expression d'un gène cible et ainsi ils permettent de simuler des mutations de type hypomorphes.

Chez *C. elegans* il existe deux types de traitement ARNi : la nutrition des vers par des clones bactériens produisant des ARN double brins du gène cible, l'injection des ARN double brins dans les gonades des hermaphrodites adultes. Ici c'est la première méthode qui a

été utilisée car elle est assez efficace et plus facile à maîtriser. Mais cette méthode par nutrition n'est pas à 100 % efficace puisque son efficacité est dépendante de plusieurs facteurs :

- la quantité de clones bactériens ingérés par les vers
- le stade auquel le vers commence à ingérer ces clones bactériens (L1, L2, L3, L4 ou adulte)

Lorsqu'un traitement ARNi est trop efficace (létale dans une étape très précoce du développement), il est possible de moduler son efficacité en ajoutant un certain pourcentage de clones bactériens HT115 sans vecteur pL4440 aux clones bactériens produisant l'ARNi du gène cible. Cela permet à l'embryon de franchir une première étape de son développement où le gène est nécessaire et de constater que le gène cible a un rôle important dans une deuxième étape de développement.

Le choix du stade de développement pour commencer le traitement ARNi tient compte de la demi-vie de la protéine du gène ciblé. En effet si la durée de demi-vie d'une protéine est longue, le traitement doit être fait à un stade précoce (L1) de façon à détruire l'ARN messager et à empêcher sa traduction en protéine. À l'inverse, si la demi-vie de la protéine est courte, le traitement peut être fait à un stade tardif (L3) puisque la production des protéines est rapide.

Dans notre cas nous, avons choisi d'observer la létalité embryonnaire causée par les ARNi et nous avons combiné le traitement ARNi de Rho GAP du *C. elegans* sur des mutants de Rho GAP. Ceci dans le but de détecter des interactions génétiques entre deux Rho GAP à la fois.

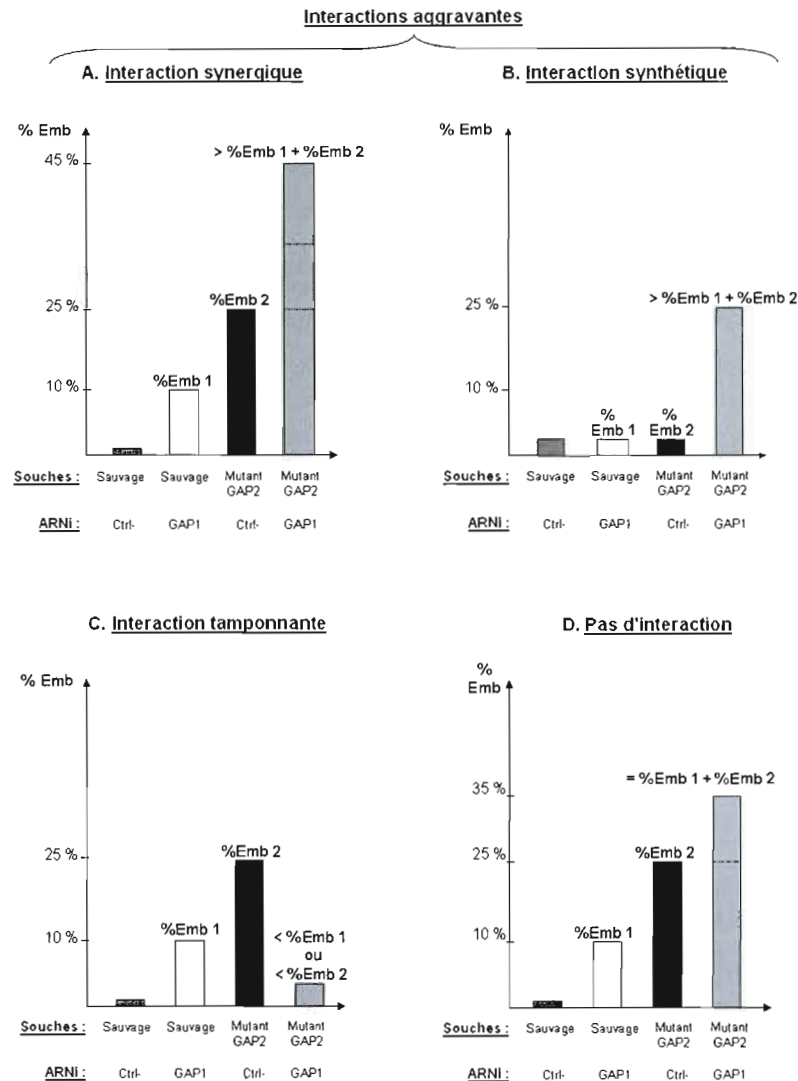


Figure 1.3 Les interactions génétiques

Il existe trois types d'interactions génétiques : les synergiques (A), les synthétiques (B) et les tamponnantes (C). Ces 3 types d'interaction permettent de déterminer si les gènes considérés sont impliqués dans la régulation du même processus biologique. Lorsque les pourcentages de létalité embryonnaire s'additionnent (D), il n'y a pas de lien fonctionnel entre les gènes mutés.

Pour déterminer quel type d'interaction existe entre 2 GAP :

- des vers sauvages sont traités avec un ARNi contrôle et un ARNi contre la GAP1
- des vers mutants pour la GAP2 sont traités avec un ARNi contrôle et un ARNi contre la GAP1

La létalité embryonnaire (%Emb) des animaux ayant été soumis à ces traitements est quantifiée.

Dans notre cas, les traitements ARNi simulent des mutations hypomorphes, alors que les mutants peuvent avoir des mutations hypomorphes ou nulles.

CHAPITRE 2

Résultats

1. Préparation du matériel biologique destiné aux traitements ARNi

Au total, 30 constructions de pL4440-Rho GAP ont été générées sachant que 14 d'entre elles sont les constructions des gènes du domaine GAP seulement et les 16 autres sont les constructions des gènes codant pour les protéines entières (voir Tableau 2.1).

Tableau 2.1 Liste des 30 constructions générées pour les 22 Rho GAP de *C. elegans*

ND = non disponible

(a) = séquence de la protéine entière

(c) = séquence du domaine GAP

Noms Rho GAP	Locus	Taille ORF (pb)	Constructions générées
chin-1 (a)	BE0003N10.2	ND	
chin-1 (c)	BE0003N10.2	ND	
cyk-4 (a)	K08E3.6	ND	
cyk-4 (c)	K08E3.6	640	pL4440-cyk-4 (c)
gei-1 (a)	F45H7.2 /7.2a	ND	
gei-1 (c)	F45H7.3 /7.2b	807	pL4440-gei-1 (c)
hum-7 (a)	F56A6.2	1887	pL4440-hum-7 (a)
hum-7 (c)	F56A6.2	651	pL4440-hum-7 (c)
ocrl-1 (a)	C16C2.3	ND	
ocrl-1 (c)	C16C2.3	654	pL4440-ocrl-1 (c)
pac-1 (a)	C04D8.1	1388	pL4440-pac-1 (a)
pac-1 (c)	C04D8.1	700	pL4440-pac-1 (c)
rga-1 (a)	W02B12.8	444	pL4440-rga-1 (a)
rga-1 (c)	W02B12.8	ND	
rga-2 (a)	Y53C10A.4	908	pL4440-rga-2 (a)
rga-2 (c)	Y53C10A.4	666	pL4440-rga-2 (c)
rga-3 (a)	K09H11.3	ND	
rga-3 (c)	K09H11.3	795	pL4440-rga-3 (c)
rga-4 (a)	Y75B7AL.4	ND	
rga-4 (c)	Y75B7AL.4	792	pL4440-rga-4 (c)
rga-5 (a)	ZK669.1a	863	pL4440-rga-5 (a)
rga-5 (c)	ZK669.1a	ND	
rga-7 (a)	C01F4.2	793	pL4440-rga-7 (a)
rga-7 (c)	C01F4.2	742	pL4440-rga-7 (c)
rga-8 (a)	T04C9.1	910	pL4440-rga-8 (a)
rga-8 (c)	T04C9.1	679	pL4440-rga-8 (c)
rga-9 (a)	C38D4.5	2514	pL4440-rga-9 (a)
rga-9 (c)	C38D4.5	749	pL4440-rga-9 (c)
rga-10 (a)	2RSSE.1	ND	
rga-10 (c)	2RSSE.1	600	pL4440-rga-10 (c)
rga-11 (a)	Y34B4A.8	604	pL4440-rga-11 (a)
rga-11 (c)	Y34B4A.8	635	pL4440-rga-11 (c)
rga-12 (a)	H08M01.2	1124	pL4440-rga-12 (a)
rga-12 (c)	H08M01.2	ND	
rga-13 (a)	F23H11.4	1003	pL4440-rga-6 (a)
rga-13 (c)	F23H11.4	708	pL4440-rga-6 (c)
rlbp-1 (a)	T23G11.5	ND	
rlbp-1 (c)	T23G11.5	824	pL4440-rlbp-1 (c)
rrc-1 (a)	F47A4.3	718	pL4440-rrc-1 (a)
rrc-1 (c)	F47A4.3	707	pL4440-rrc-1 (c)
srgp-1 (a)	F12F6.5	1059	pL4440-srgp-1 (a)
srgp-1 (c)	F12F6.5	690	pL4440-srgp-1 (c)
syd-1 (a)	F35D2.5	ND	
syd-1 (c)	F35D2.5	ND	

1.1. Électrophorèse sur gel d'agarose des pL4440-Rho GAP purifiés à partir de cultures de DH5 α

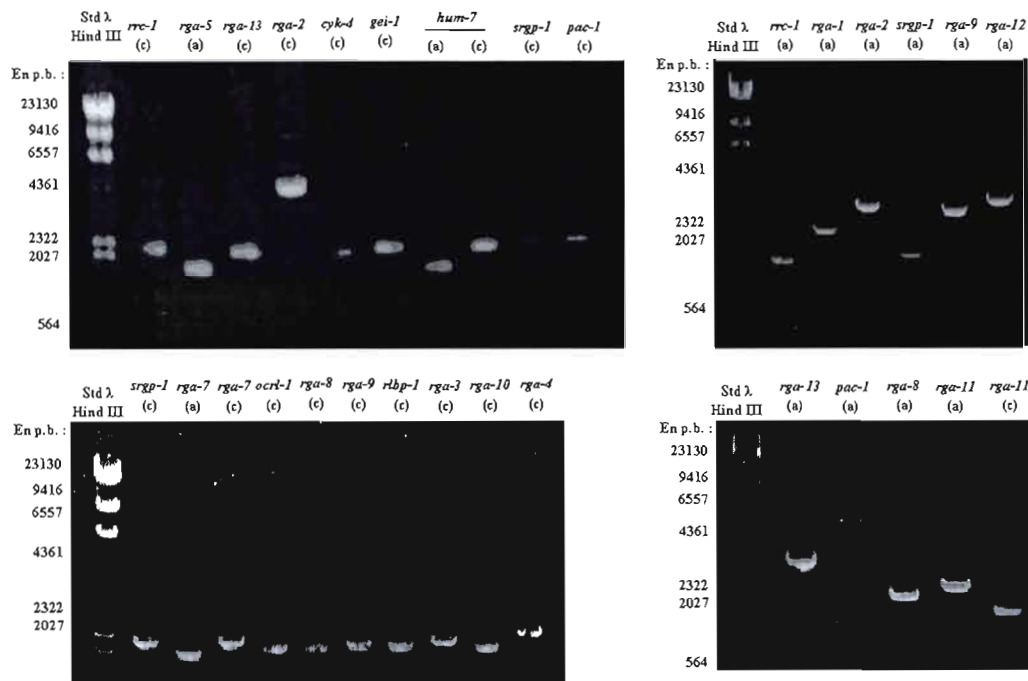


Figure 2.1 Électrophorèse sur gels d'agarose des pL4440-Rho GAP purifiés à partir de cultures de clones de DH5 α -pL4440-Rho GAP

Les plasmides ont été purifiés sur des colonnes Qiaprep (Qiagen) à partir de 4 ml de cultures de 16 heures à 37°C des clones DH5 α -pL4440-Rho GAP. 2 μ L d'échantillon sont chargés avec pour standard λ Hind III, sur un gel d'agarose 1 % contenant 0,001 mg/ml de bromure d'éthidium. L'électrophorèse est faite à 100 Volts constants pendant 1 heure. Une photographie est faite sous U.V. (c) est le domaine GAP seulement, alors que (a) est la protéine entière. Le plasmide pL4440 vide fait 2790 pb.

Nous pouvons constater que les vecteurs recombinés pL4440-Rho GAP se trouvent sous forme majoritairement enroulée, donc en assez bonne condition (voir Figure 2.1). Nous avons mesuré leur concentration avec l'appareil NanoDrop entre 50 et 300 ng/ μ L. Nous avons donc transformé 0,5 à 1 μ L de plasmide dans des HT115 compétentes (cf. méthodes).

1.2. PCR des plasmides purifiés à partir de cultures de DH5 α -pL4440-Rho GAP et d'HT115-pL4440-Rho GAP

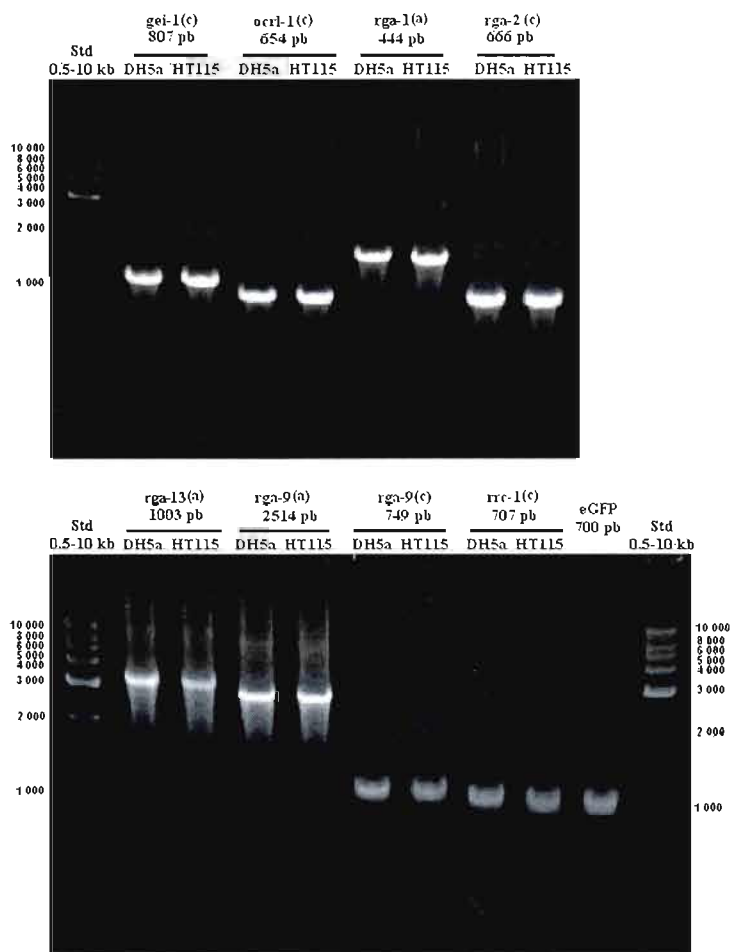


Figure 2.2 Photographies des gels d'agarose des inserts (Rho GAP) dans le pL4440 amplifiés par PCR

50 ng de pL4440-Rho GAP purifiés à partir de cultures de DH5 α et d'HT115 (voir Figure 2.1 et Figure 2.4) sont amplifiés par PCR avec les amorces pour le pL4440. (c) est le domaine GAP seulement, alors que (a) est la protéine entière. 10 μ L des échantillons sont chargés avec pour standard 0,5-10 kpb, sur un gel d'agarose 1 % contenant 0,001 mg/ml de bromure d'éthidium. L'électrophorèse est faite à 100 Volts constants pendant 1 heure. Une photographie est faite sous U.V. après migration. Le plasmide pL4440 vide fait 2790 pb.

Seuls les plasmides pL4440-Rho GAP et le pL4440-eGFP utilisés pour les traitements ARNi des vers (voir Figure 2.5) ont été amplifiés par PCR. Nous avons été capable de retrouver la même taille pour chaque plasmide dans les DH5 α et les HT115. Par contre elles ne correspondent pas à la taille attendue du fragment provenant de l'ORFeome sauf *rga-9* à 2514 pb et *rga-13* de HT115 à 1008 pb. Afin de nous assurer que la séquence insérée dans le pL4440 corresponde a nos gènes d'intérêt, nous avons décidé de procéder à un séquençage.

Il est important ici de remarquer que pour faire un traitement ARNi contre un gène, il n'est pas nécessaire d'avoir la bonne taille de la séquence, mais un fragment de la séquence du gène peut être suffisant pour avoir l'effet d'interférence sur l'expression du gène. C'est pour cette raison également que nous avons testé les ARNi dans certains cas avec la séquence du gène en entier et celle seulement du domaine GAP. Puisque les bandes amplifiées par PCR sont les mêmes dans les deux sortes de bactéries et que les plasmides sont en meilleure condition de conservation dans les DH5 α (voir section ci-dessous), nous avons décidé d'envoyer à séquencer uniquement les échantillons de plasmides purifiés à partir des cultures de DH5 α .

1.3. Séquençage sur les plasmides pL4440-Rho GAP purifiés à partir de cultures de DH5 α

1.3.1. Purification des plasmides

Une autre purification des plasmides recombinés sur colonne Qiaprep (Qiagen) a été nécessaire car nous avons besoin entre 100 à 500 ng/ μ L de plasmides purifiés pour le séquençage.

Remarque : la Rho GAP *cyk-4* a été ajouté aux échantillons pour le séquençage car l'ARNi de cette GAP a été utilisé dans le chapitre 1 de la quatrième partie.

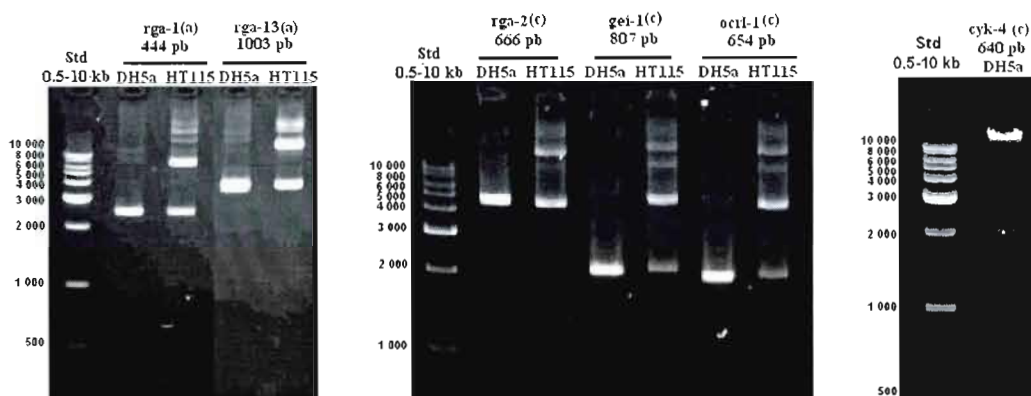


Figure 2.3 Photographies des gels d'agarose des pL4440-Rho GAP purifiés à partir de cultures de DH5 α et d'HT115 destinés au séquençage

Les plasmides ont été purifiés sur des colonnes Qiaprep (Qiagen) à partir de 10 à 20 ml de cultures de 16 heures à 37°C des clones DH5 α -pL4440-Rho GAP et HT115- pL4440-Rho GAP. 1 μ L d'échantillon sont chargés avec pour standard 0,5-10 kpb, sur un gel d'agarose 1 % contenant 0,001 mg/ml de bromure d'éthidium. L'électrophorèse est faite à 100 Volts constants pendant 1 heure. Une photographie est faite sous U.V. après migration. (c) est le domaine GAP seulement, alors que (a) est la protéine entière. Le plasmide pL4440 vide fait 2790 pb.

On observe plusieurs bandes dans chaque puits (voir Figure 2.3), qui sont des formes déroulées du plasmide (en haut des gels) vers des formes superenroulées vers le bas. On observe que les bandes aux différentes formes (enroulée, superenroulée ...) n'ont pas la même intensité dépendamment si les plasmides ont été recueillis chez les HT115 ou chez les DH5 α .

On remarque que les plasmides issues des HT115 sont plutôt sous des formes enroulées voir déroulées (vers 4000 pb et plus), alors que les plasmides issus des DH5 α sont plutôt sous forme superenroulée (vers 2000 pb). Cependant, on observe les mêmes bandes chez les deux sortes de bactéries pour un même plasmide pL4440-Rho GAP. Nous pouvons donc considérer que nous avons bien transféré les mêmes plasmides des DH5 α aux HT115.

De plus, il est important de noter que plus un plasmide est déroulé et moins il est en bonne condition pour sa conservation dans la bactérie. Donc les plasmides sont en meilleure condition de conservation dans les DH5 α .

Remarque : la bande des plasmides pL4440-cyk-4 issu des bactéries HT115 n'est pas sur le gel de droite à côté de la bande des plasmides pL4440-cyk-4 issu des bactéries DH5 α , mais on peut retrouver cet échantillon sur la Figure 2.4 dans le gel du haut.

1.3.2. Séquençage

Tableau 2.2 Résultats du séquençage des plasmides pL4440 contenant les séquences entières ou partielles des gènes de Rho GAP du *C. elegans*

(a) = séquence de la protéine entière

(c) = séquence du domaine GAP

Noms Rho GAP	Locus	Taille ORF (pb)	Identité (en pb et %)
<i>cyk-4</i> (c)	K08E3.6	640	644/645 pb (99 %)
<i>gei-1</i> (c)	F45H7.2b	807	475/483 pb (98 %)
<i>ocrl-1</i> (c)	C16C2.3	654	644/644 pb (100 %)
<i>rga-1</i> (a)	W02B12.8	444	727/732 pb (99 %)
<i>rga-2</i> (c)	Y53C10A.4	666	655/668 pb (98 %)
<i>rga-13</i> (a)	F23H11.4	1003	768/796 pb (96 %)

Remarque : la Rho GAP *cyk-4* a été ajouté aux échantillons pour le séquençage car l'ARNi de cette GAP a été utilisé dans le chapitre 1 de la quatrième partie.

Voir en APPENDICE E, pour chaque GAP listée dans le tableau ci-dessus :

- Séquences ADN
- Résultats du séquençage
- Résultats du BLAST

Pour les GAP *cyk-4*, *ocrl-1* et *rga-2*, la séquence reconnue lors du BLAST contient le domaine de la GAP. Les séquences reconnues lors du BLAST de *gei-1* et *rga-1* correspondent à la première moitié des séquences entières. Pour *rga-13*, c'est la partie N-terminale de la séquence entière qui a été reconnue lors du BLAST (voir APPENDICE E).

D'autre part, les identités entre la séquence de requête (séquence obtenue lors du séquençage) et la séquence de la base de données (séquence connue du *C. elegans*) donnent des scores entre 100 et 96 % sur une longueur de 475 à 768 pb (voir Tableau 2.2).

1.4. Génération des clones bactériens destinés aux traitements ARNi

1.4.1. Vérification de la transformation des HT115 par les pL4440-Rho GAP

1.4.1.1. Par électrophorèse des plasmides purifiés

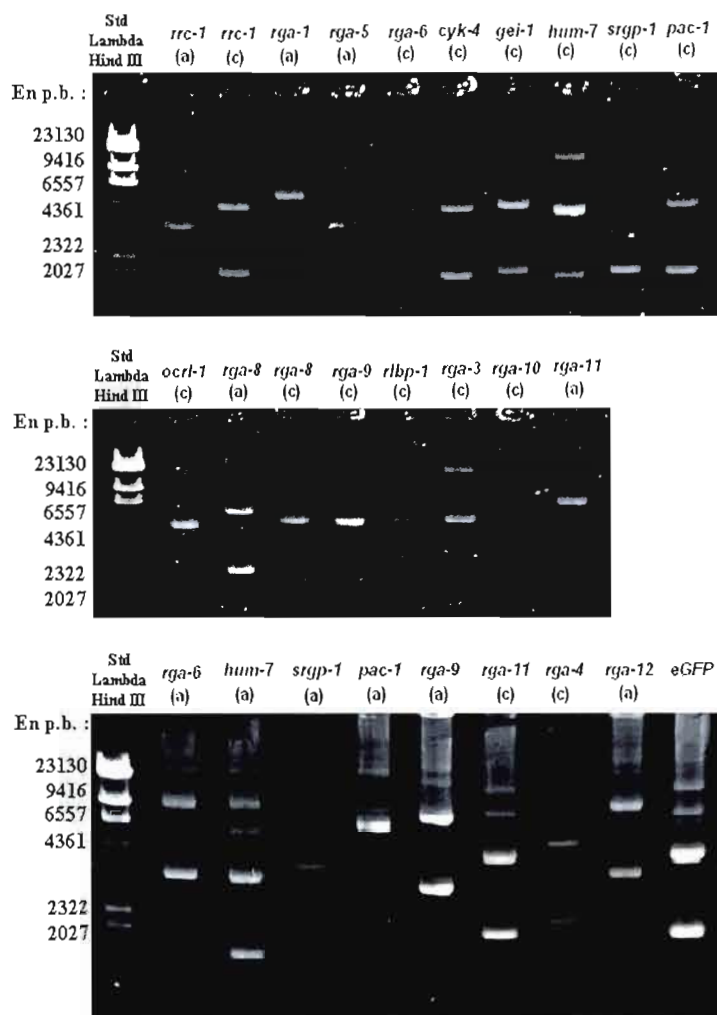


Figure 2.4 Gels d'agarose des pL4440-Rho GAP transformés dans les HT115

Les plasmides recombinés pL4440-Rho GAP sont purifiés sur des colonnes Qiaprep (Qiagen) à partir de 4 ml de cultures de 16 heures à 37°C des clones HT115-pL4440-Rho GAP. 2 μ L d'échantillon sont chargés avec pour standard λ Hind III, sur un gel d'agarose 1 % contenant 0,001 mg/ml de bromure d'éthidium. L'électrophorèse est faite à 100 Volts constants pendant 1 heure. Une photographie est prise sous U.V. après migration. (c) est le domaine GAP seulement, alors que (a) est la protéine entière. Le plasmide pL4440 vide fait 2790 pb.

On observe des formes déroulées du plasmide (en haut des gels) avec plusieurs formes superenroulées (vers le bas des gels) (voir Figure 2.4). La concentration a été déterminée par mesure sur l'appareil Nanodrop, et 50 ng ont été utilisés pour la PCR (voir section 1.2).

1.4.1.2. Par PCR

Voir section 1.2.

Nous avons testé en tout 66 interactions génétiques entre treize mutants et 8 ARNi différents (voir Figure 2.5). Nous avons montré que 18,18 % des paires de gènes interagissent génétiquement : 9,09 % sont de ces interactions sont aggravantes, et 9,09 % sont tamponnantes.

Une seule interaction tamponnante a été identifiée avec certitude (n=3, *ocrl-1* avec *rga-5*). Deux interactions aggravantes de type synergique ont été identifiées avec un bon niveau de certitude (n=2, *srgp-1* avec *ocrl-1* et *rga-5* avec *gei-1*). Neuf interactions ont été identifiées avec un faible niveau de certitude (n=1).

2.2. Caractérisation des interactions avec la Rho GAP *rga-5* au cours du développement embryonnaire de *C. elegans*

Le mutant *rga-5(ok1498)* s'est avéré avoir une létalité embryonnaire manifeste d'environ 30 % à 18°C contrairement aux autres mutants (voir Figure 2.6 et Figure 2.7). Son taux de létalité embryonnaire permettait, de voir plus clairement des variations dans le pourcentage de sa létalité embryonnaire avec des traitements ARNi, il a donc attiré notre attention et nous avons décidé de l'étudier spécifiquement.

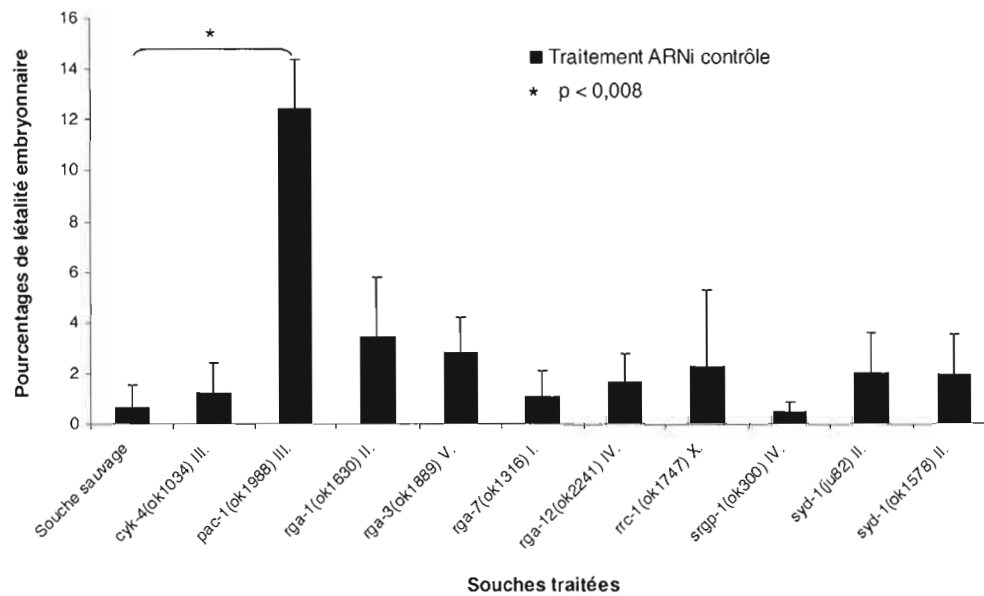


Figure 2.6 Pourcentage de létalité embryonnaire des mutants des Rho GAP chez *C. elegans* après traitement à l'ARNi contrôle

Les mutants des Rho GAP de *C. elegans* et la souche sauvage ont été traités à l'ARNi contrôle (eGFP) à 18°C pendant 72 heures afin de connaître leur pourcentage de létalité embryonnaire initiale. Le traitement a été répété au moins deux fois, sauf pour les mutants *cyk-4(ok1034) III* et *pac-1(ok1988) III* pour qui le traitement n'a été fait qu'une seule fois. Seul le mutant *pac-1(ok1988) III* présente une létalité embryonnaire de plus de 10 % (résultat préliminaire).

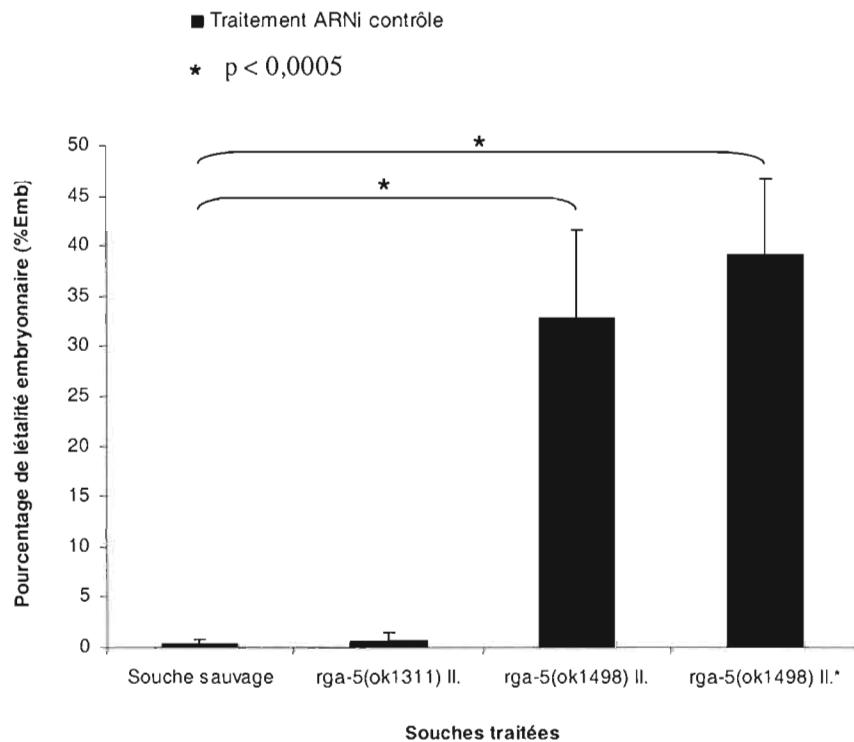


Figure 2.7 Pourcentage de létalité embryonnaire des mutants pour la Rho GAP *rga-5* après traitement à l'ARNi contrôle

Les mutants pour le gène *rga-5* et la souche sauvage ont été traités à l'ARNi contrôle (eGFP) à 18°C pendant 72 heures afin de connaître leur pourcentage de létalité embryonnaire initiale. *rga-5(ok1311)II* est le mutant RB1247, *rga-5(ok1498)II** est le mutant VC992, et *rga-5(ok1498)II* est le mutant RB1353.

La mutation dans l'intron du gène *rga-5* du mutant RB1247 (*rga-5(ok1311)II*) ne cause pas de létalité embryonnaire (voir Figure 2.7) contrairement à la mutation *rga-5(ok1498)* située dans des exons du gène *rga-5* (voir Figure 2.8).

2.2.1. Caractérisation moléculaire de la mutation dans *rga-5*

Trois souches portant des mutations dans le gène de *rga-5* sont disponibles chez CGC (voir aussi Tableau 1.1).

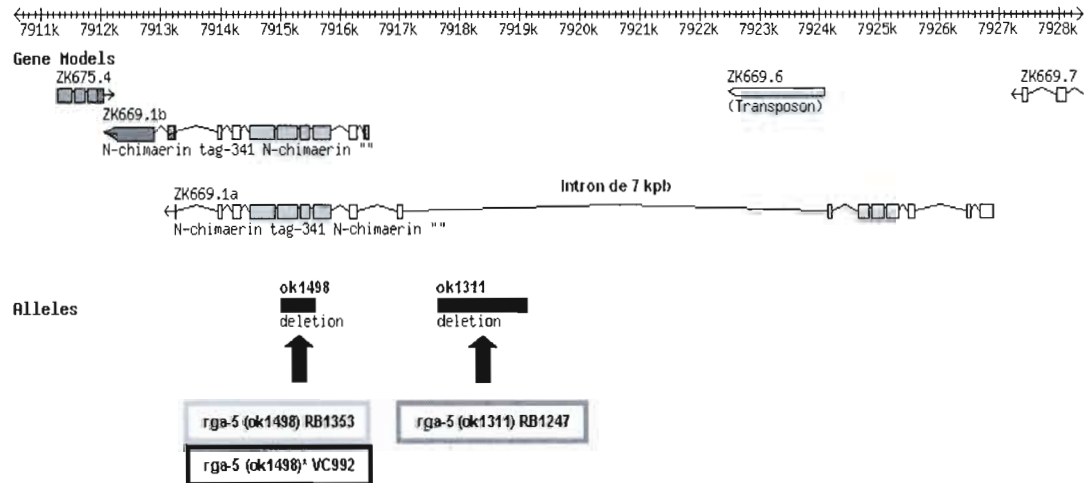


Figure 2.8 Schéma des mutations dans le gène de la Rho GAP *rga-5*, portées par les souches RB1247, RB1353 et VC992

Le mutant RB1247 possède une délétion d'environ 2600 paires de bases à l'intérieur de l'intron d'environ 7 kpb. Tandis que les mutants RB1353 et VC992 possèdent la même délétion de 1050 paires de bases dans les exons codant entre autre pour le domaine GAP de la protéine.

Nous ne savons pas pourquoi ces souches possèdent deux noms différents (voir Figure 2.8) et si elles ont d'autres mutations qui les différencient c'est pourquoi nous les avons testées parallèlement.

2.2.2. La mutation de *rga-5(ok1498)* provoque un arrêt de développement chez *C. elegans*

2.2.2.1. Anomalie de l'élongation

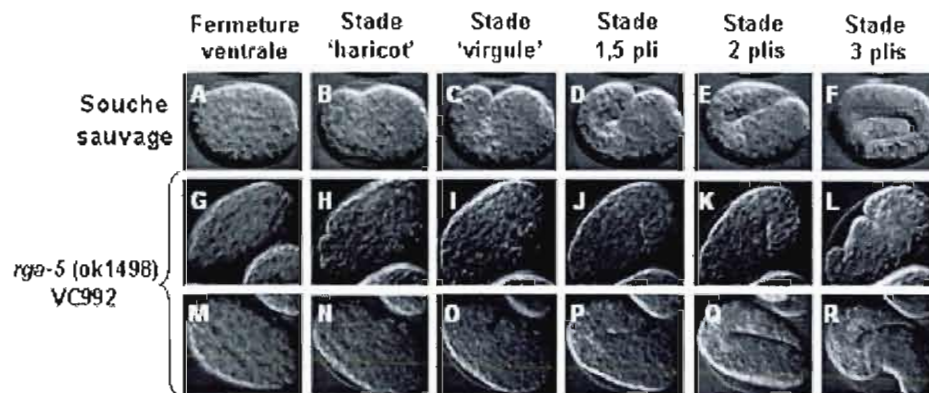


Figure 2.9 Photographies du développement embryonnaire du mutant *rga-5(ok1498)* comparé au développement de la souche sauvage

Les photographies des œufs du mutant VC992 et du sauvage ont été prises à intervalles de 2 minutes depuis le stade d'environ 100 cellules jusqu'à la fin du développement. Seules les photos à certains stades sont montrés sur la figure, et le développement de la souche sauvage aux mêmes stades (photos A à F) est comparé au développement du mutant VC992 (photos G à L et M à R).

Dans ces photographies, on peut remarquer que le mutant *rga-5* n'atteint pas le stade plié en trois (voir photos L et R Figure 2.9) contrairement au sauvage (photo F Figure 2.9). De plus, l'embryon du mutant VC992 plié en deux (photos K à L et Q à R Figure 2.9) s'hypercontracte sans pouvoir s'allonger comme l'embryon sauvage (photos E à F Figure 2.9). À partir du stade 1,5 plis, on observe chez certains embryons mutants une cambrure dorsale anormale (comparez les photos D à F du sauvage avec les photos P à R du mutant VC992 à la Figure 2.9). Ces embryons se développent cependant normalement jusqu'au stade adulte.

2.2.3. Caractérisation de cinq nouvelles interactions avec la Rho GAP *rga-5*

2.2.3.1. Interaction tamponnante entre *rga-5* et *ocrl-1*

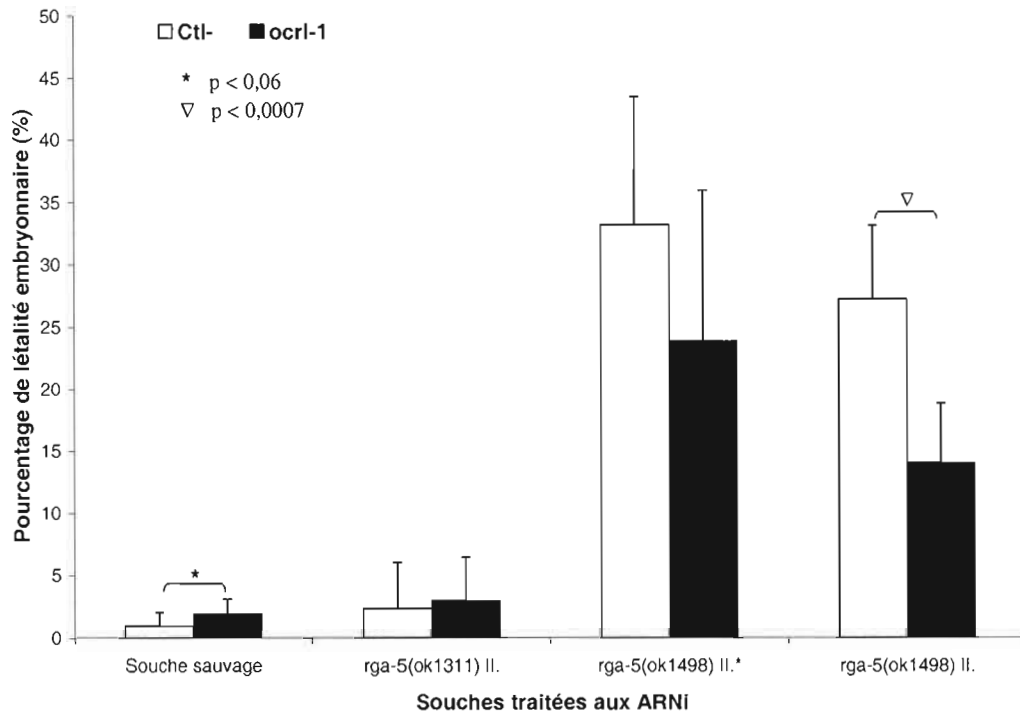


Figure 2.10 Interaction tamponnante entre *rga-5* et *ocrl-1*

Chaque souche est traitée avec l'ARNi contrôle (eGFP) et l'ARNi contre la Rho GAP *ocrl-1*. Les vers sont synchronisés en L1 et nourris des clones bactériens produisant les ARNi contre *ocrl-1* et le contrôle (eGFP) jusqu'à l'âge adulte (72 heures) à 18°C. Après que les adultes ont pondu, le test de létalité embryonnaire est effectué (voir section matériels et méthodes). Les souches RB1353 (*rga-5(ok1498)II*) et RB1247 (*rga-5(ok1311)II*) ont été testé trois fois alors que VC992 (*rga-5(ok1498)II**) a été testé deux fois. Un test statistique (student T-test) est fait pour comparer les pourcentages de létalité embryonnaire entre le contrôle et le traitement ARNi contre *ocrl-1*. Le triangle et l'étoile montrent une différence significative entre les deux traitements ARNi sur respectivement la souche RB1353 et la souche sauvage.

Le traitement d'ARNi contre *ocrl-1* ne cause pas de variation de pourcentage de létalité embryonnaire au mutant qui porte la mutation dans l'intron : *rga-5(ok1311)II* (voir Figure 2.10). À l'inverse, la mutation *rga-5(ok1498)II* cause une létalité embryonnaire d'environ 33 et 27 % respectivement aux souches VC992 et RB1353.

De plus les trois traitements d'ARNi contre *ocrl-1* ont causé une diminution de la létalité embryonnaire d'environ 10 % chez la souche RB1353 soit presque la moitié du taux de létalité embryonnaire causé par la mutation *rga-5(ok1498)II* (voir Figure 2.10). Nous pouvons en conclure que les Rho GAP *ocrl-1* et *rga-5* interagissent génétiquement et présentent une interaction de type tamponnante.

2.2.3.2. Interaction aggravante entre *rga-5* et *gei-1*

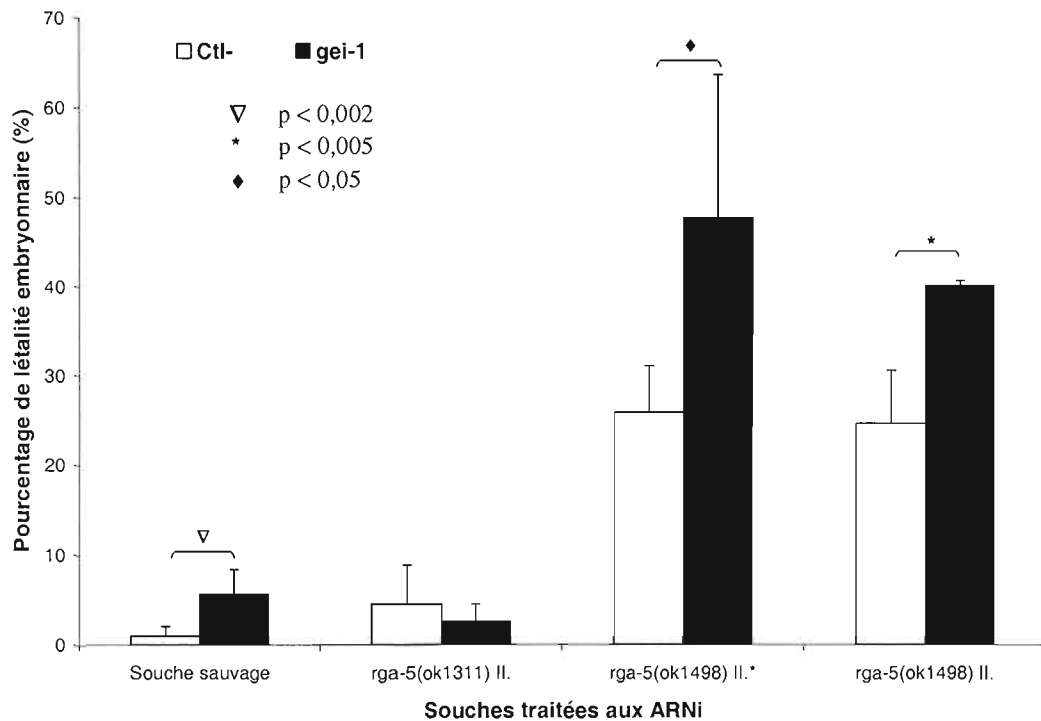


Figure 2.11 Interaction aggravante entre *rga-5* et *gei-1*

Chaque souche est traitée avec l'ARNi contrôle (eGFP) et l'ARNi contre la Rho GAP *gei-1*. Les vers sont synchronisés en L1 et nourris des clones bactériens produisant les ARNi contre *gei-1* et le contrôle (eGFP) jusqu'à l'âge adulte (72 heures) à 18°C. Après que les adultes ont pondu, le test de létalité embryonnaire est effectué (voir section matériels et méthodes). Tous les mutants ont été testés deux fois avec l'ARNi contre *gei-1*. Un test statistique (student T-test) est fait pour comparer les pourcentages de létalité embryonnaire entre le contrôle et le traitement ARNi contre *gei-1*. Le triangle montre une différence significative entre les deux traitements ARNi inférieure à 0,002 sur la souche sauvage ; l'étoile montre une différence significative (Student T-test, $p < 0,05$) sur la souche RB1353 ; et le losange montre une différence significative (Student T-test, $p < 0,05$) avec la souche VC992.

Le traitement d'ARNi contre *gei-1* sur la souche sauvage cause une légère augmentation de la létalité embryonnaire de 1 à 5 % par rapport au traitement ARNi contrôle (voir Figure 2.11). Il n'y a pas de réelle variation chez la souche avec la mutation *rga-5(ok1498)II*. Par contre pour les mutants avec la mutation *rga-5(ok1498)II*, on peut observer une augmentation de 21 % chez la souche VC992 et d'environ 10 % chez la souche RB1353. Les Rho GAP *gei-1* et *rga-5* interagissent génétiquement avec une interaction aggravante. De plus, cette aggravation du phénotype de létalité embryonnaire est de type synergique avec la souche RB1353 puisque la différence entre le traitement contrôle et le traitement contre *gei-1* (~15 %) est supérieur à la somme des létalités embryonnaires causées par le traitement contre *gei-1* sur la souche sauvage (5,68 %) et pour la souche avec la mutation *rga-5(ok1498)II*.

2.2.3.3. Interaction aggravante synergique possible entre *rga-5* et *rga-2*

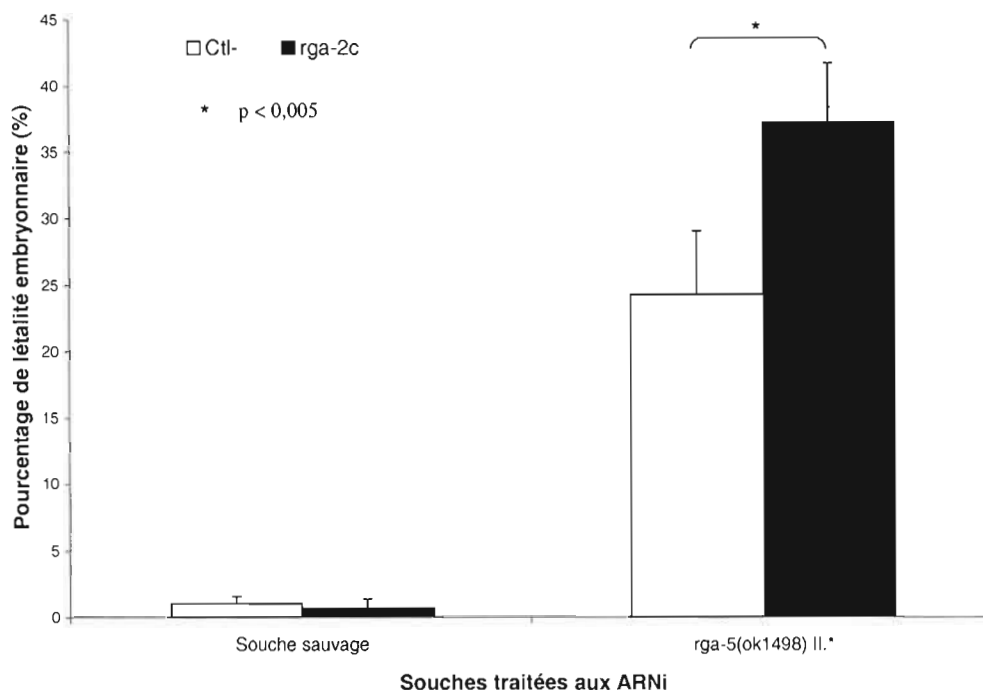


Figure 2.12 Interaction aggravante possible entre *rga-5* et *rga-2*

Chaque souche est traitée avec l'ARNi contrôle (eGFP) et l'ARNi contre la Rho GAP *rga-2*. Les vers sont synchronisés en L1 et nourris des clones bactériens produisant les ARNi contre *rga-2* et le contrôle (eGFP) jusqu'à l'âge adulte (72 heures) à 18°C. Après que les adultes aient pondu, le test de létalité embryonnaire est effectué (voir section matériels et méthodes). Le mutant VC992 (*rga-5(ok1498)II**) ainsi que la souche sauvage n'ont été testé qu'une fois avec l'ARNi contre *rga-2*. Un test statistique (student T-test) est fait pour comparer les pourcentages de létalité embryonnaire entre le contrôle et le traitement ARNi contre *gei-1*. L'étoile montre une différence significative entre les deux traitements ARNi (student T-test, $p < 0,005$) avec la souche VC992.

La souche sauvage ne présente pas de variation de létalité embryonnaire après traitement à l'ARNi contre *rga-2* (voir Figure 2.12). Le mutant VC992 passe d'une létalité de 24 % avec le traitement contrôle à 37% avec le traitement d'ARNi contre *rga-2*. Donc il existe une interaction aggravante de type synergique entre *rga-5* et *rga-2*. Cette interaction a été confirmée après notre étude par un autre étudiant stagiaire de notre laboratoire, confirmant de ce fait notre étude préliminaire.

2.2.3.4. Interaction aggravante synergique possible entre *rga-5* et *rga-13*

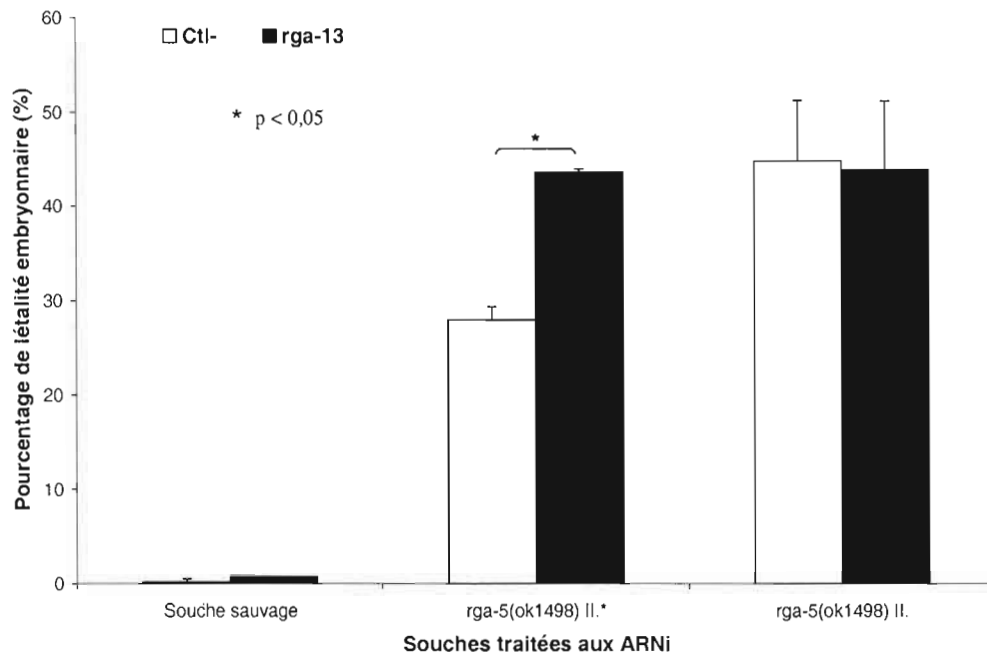


Figure 2.13 Interaction aggravante de type synergique entre les Rho GAP *rga-5* et *rga-13*. Chaque souche a été traitée avec l'ARNi contrôle (eGFP) et l'ARNi contre la Rho GAP *rga-13*. Les vers ont été synchronisés en L1 et nourris des clones bactériens produisant les ARNi contre *rga-13* et le contrôle (eGFP) jusqu'à l'âge adulte (72 heures) à 18°C. Après que les adultes aient pondus, ils ont été retirés et les œufs ont été comptés. Après 24 heures, les œufs restants ont été recomptés et le calcul du pourcentage de létalité embryonnaire a été effectué (voir section matériels et méthodes). Le mutant RB1353 (*rga-5(ok1498)II*) a été traité une fois avec l'ARNi contre *rga-13* alors que le mutant VC992 (*rga-5(ok1498)II**) a été traité 2 fois. L'étoile montre une différence significative entre les deux traitements ARNi (student T-test, $p < 0,05$) avec la souche VC992 (*rga-5(ok1498)II**).

Le traitement d'ARNi contre *rga-13* ne cause pas d'effet sur la souche sauvage et le mutant RB1353 *rga-5(ok1498)II* (voir Figure 2.13). Par contre, on observe une augmentation de la létalité embryonnaire de 28 % à 43 % lorsque le mutant VC992 *rga-5(ok1498)II** est traité avec l'ARNi contre *rga-13*. Il est donc difficile de conclure ici car les deux souches portant la même mutation *rga-5(ok1498)II* n'ont pas donné le même résultat avec le même traitement. Il sera nécessaire de reproduire le test sur les deux mutants.

CHAPITRE 3

Discussion et conclusions

1. Discussion

Sur les 66 interactions génétiques testées entre les Rho GAP, seule l'interaction tamponnante d'*ocrl-1* avec *rga-5* est une certitude (n=3). Les interactions aggravantes de type synergique entre *srgp-1* et *ocrl-1* et entre *rga-5* et *gei-1* ont un bon niveau de certitude (n=2). Mais neuf autres interactions ont été identifiées avec un faible niveau de certitude (n=1). Le matériel utilisé pour les traitements ARNi, et pour lequel nous avons obtenu des résultats intéressants (*cyk-4* (voir le chapitre 4), *gei-1*, *ocrl-1*, *rga-1*, *rga-2* et *rga-13*), a été vérifié par séquençage. Et les séquences obtenues correspondent bien aux séquences voulues.

Les souches VC992 et RB1353 présentant la mutation *rga-5(ok1498)II* ont attiré notre attention car ce sont les seules à exprimer une létalité embryonnaire de plus de 30%, les autres souches n'atteignant au maximum que 15% (voir Figure 2.6 et Figure 2.7). Nous avons caractérisé le phénotype de létalité embryonnaire de ces mutants et avons observé que *rga-5* jouerait un rôle au cours de l'élongation (voir Figure 2.9).

Attardons-nous sur le processus de l'élongation, en particulier le stade précoce. Au début de la morphogénèse, des cellules de l'épiderme sur la face dorsale de l'embryon vont migrer ventralement pour recouvrir et fermer l'embryon (Priess et Hirsh, 1986 ; Williams-Masson et al., 1997). Juste après la fermeture ventrale de l'épiderme, l'embryon passe d'un stade où il a la forme d'un haricot à une forme de vers : ce processus est l'élongation de l'embryon. L'élongation se fait le long de l'axe antéro-postérieur : les surfaces apicales des cellules épidermales se raccourcissent latéralement autour de l'embryon, pendant qu'elles s'allongent longitudinalement (Sulston et al., 1983 ; Priess et Hirsh, 1986).

L'élongation se divise en deux phases distinctes :

- l'élongation précoce entre le stade de « virgule » (~350 minutes) et le stade de deux plis
- l'élongation tardive de deux plis à quatre plis (~600 minutes).

Les tissus essentiels pour l'élongation sont l'épiderme (élongation précoce et tardive) et les muscles (élongation tardive uniquement).

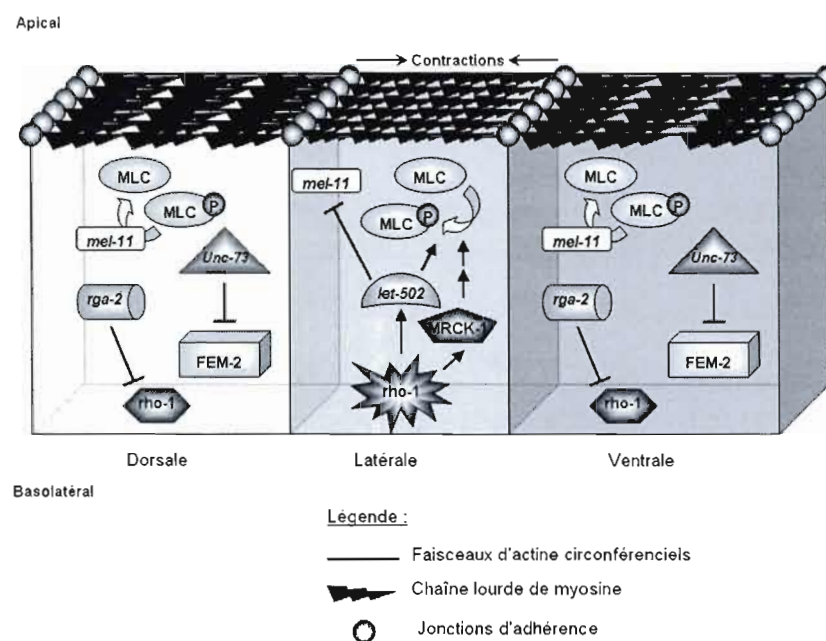


Figure 3.1 Schéma de la contraction des cellules latérales de l'hypoderme lors de l'élongation de l'embryon de *C. elegans*

Les activations des voies sont matérialisées par des flèches pointues et les inactivations de voies sont matérialisées par des flèches avec une barre horizontale.

L'élongation précoce commence par la réorganisation du cytosquelette d'actine de l'épiderme dorsal et ventral (les microfilaments d'actine et les microtubules) en faisceaux d'actine parallèles circonférentiels (FAC) (Priess et Hirsh, 1986 ; Williams-Masson et *al.*, 1997). Cette organisation des faisceaux d'actine ne persiste pas après que l'élongation soit complète (Costa et *al.*, 1997 ; Williams-Masson et *al.*, 1997 ; voir Figure 3.1).

Des analyses génétiques ont montré le rôle crucial de la contraction lors de l'élongation. En effet, la perte de fonction de la Rho-kinase *let-502* (effecteur de *rho-1*)

résulte en une réduction des mécanismes de contraction de la machinerie actine-myosine des cellules de l'hypoderme latérale et inversement la perte de fonction de la myosine phosphatase *mel-11* résulte en une hypercontraction des cellules de l'hypoderme ventrales et dorsales entraînant la rupture des embryons à un stade précoce de l'élongation. Les doubles mutants *mel-11; let-502* se développent en moyenne plus normalement que les simples mutants. Ceci suggère que *LET-502* et *MEL-11* agissent de manière antagoniste lors de l'élongation et que leur fonction est redondante avec une autre voie de signalisation contrôlant aussi la contraction de la machinerie actine-myosine au cours de l'élongation (Wissmann *et al.*, 1999; Wissmann *et al.*, 1997 ; voir Figure 3.1).

Il a été démontré que la phosphatase *fem-2* participe à une voie parallèle à *mel-11* et *let-502*. *Unc-73*, une GEF pour les GTPases *Rho1* et les *Rac* (*ced-10*, *rac-2*, *mig-2*) jouerait un rôle dans cette voie parallèle en amont de *fem-2* (Piekny *et al.*, 2000 ; et voir Figure 3.1). D'autre part, la phosphorylation de deux résidus de sérine et thréonine conservés dans *MLC-4* est importante pour l'activité de la myosine II et son organisation. Les homologues de *let-502/ROCK*, *pak-1/PAK* et *mrck-1/MRCK* sont des kinases qui régulent de manière redondante la phosphorylation des chaînes légères de myosine (MLC). En effet, la perte combinée de *let-502/ROCK* et *pak-1/PAK*, ou *let-502/ROCK* et *mrck-1/MRCK*, empêche complètement l'élongation (Galli *et al.*, 2009). Mais, une forme constitutivement active de *MLC-4* permet de restaurer la perte de *MRCK*. Ceci suggère que *let-502/ROCK* et *mrck-1/MRCK* régulent *MLC-4* et la myosine phosphatase (Galli *et al.*, 2009 ; voir Figure 3.1).

La machinerie de contraction dirigée par l'actomyosine est active principalement dans les cellules latérales qui transmettent les forces de contraction aux cellules ventrales et dorsales via les FAC et les jonctions cadhérine-caténine (voir Figure 3.1). Lorsque l'élongation commence, *let-502*, *pak-1* phosphoryleraient *mlc-4* pour promouvoir la contraction via l'actomyosine, alors que *mel-11* promeut la relaxation. *let-502* et *mrck-1* inhiberait l'activité de *mel-11* dans les cellules latérales entraînant sa relocalisation du cytosol aux jonctions cellulaires. *let-502* est indirectement inactivée dans les cellules ventrales et dorsales par *rga-2*, une GAP spécifique pour *Rho-1* (Diogon *et al.*, 2007).

Les deux chaînes lourdes non musculaires, *nmy-1* et *nmy-2* ont des rôles partiellement redondants dans l'élongation et sont probablement régulées par *mlc-4* (Piekny *et al.*, 2003).

Afin de convertir la force de contraction en élongation coordonnée à travers l'épiderme, la liaison des FAC aux jonctions d'adhérence est essentiel. Les mutations des gènes codant pour les protéines cœur du complexe cadhérine-caténine (*hmp-1*, *hmp-2*, et *hmr-1*) ou les protéines associées résulte en l'échec de l'élongation ou à des anomalies dues au détachement des FAC (Costa *et al.*, 1998).

Les mutants *rga-5(ok1498)II* montrent une forme d'hypercontraction des embryons différente de celle observée pour les mutants *mel-11* causant la rupture des embryons à un stade précoce de l'élongation (Williams-Masson *et al.*, 1997 ; Wissmann *et al.*, 1999). Il faut rappeler que lors de l'élongation, *let-502* (effecteur de *rho-1*) augmente la contraction dans les cellules latérales pendant que *mel-11* inhibe la contraction dans les cellules ventrales et dorsales (Wissmann *et al.*, 1999 ; Wissmann *et al.*, 1997). Si *mel-11* ou *rga-2* ne sont plus fonctionnels, les cellules ventrales et dorsales se contractent au lieu de se décontracter ce qui cause la rupture de l'embryon. Puisque nous avons observé que la mutation *rga-5(ok1498)II* provoque une hypercontraction lors de l'étape précoce de l'élongation (avant le stade deux plis, voir Figure 2.9) et que *rga-5* et *rga-2* ont une interaction aggravante synergique possible (n=1) nous pouvons émettre l'hypothèse que *rga-5* pourrait être une GAP pour *rho-1* ou qu'elle puisse jouer un rôle dans la voie parallèle de *mel-11/let-502*. Ceci pourra être vérifié par un test catalytique entre *rga-5* et *rho-1*.

De plus, quatre nouvelles interactions avec la Rho GAP *rga-5* ont été mises en évidence. Nous avons démontré avec certitude (n=3) qu'*ocrl-1* a une interaction tamponnante avec *rga-5*. Cela signifie que ces deux GAP sont dans des voies de signalisation antagonistes lors de l'élongation (voir Figure 3.2). La mutation d'*OCRL1* est responsable du syndrome de Lowe chez l'humain (Faucherre *et al.*, 2003). La littérature sur les mammifères est en accord avec les résultats que nous avons obtenus. En effet, *OCRL1* ne se lie pas avec *RhoA* (mais avec *Rac-1*) alors que *PARG1*, l'homologue humain de *rga-5*, *PARG1* est une Rho GAP pour *RhoA* (Faucherre *et al.*, 2003 ; Saras *et al.*, 1997).

Une autre diminution de la létalité embryonnaire causée par la mutation *rga-5(ok1498)II* a été observée avec le traitement RNAi contre la Rho GAP *rga-1*. Cette GAP a pour cible *cdc-42* chez *C. elegans* (Jenna *et al.*, 2005). Ceci suggère que *rga-1* et *rga-5*

agiraient dans deux voies antagonistes dans l'élongation (voir Figure 3.2) et probablement sur deux GTPases différentes puisque la suppression de *rga-1* compense la suppression de *rga-5*.

Nous avons observé une interaction aggravante synergique entre les Rho GAP *rga-5* et *gei-1*. Cette dernière a pour homologue chez les mammifères *p122-Rho GAP* (voir Figure 2.1 de la première partie). En 1999, une publication sur cette Rho GAP nous apprend qu'elle a une activité spécifique pour *RhoA in vitro* et qu'elle supprime *in vivo* la formation des fibres du stress et les adhésions focales induites par l'acide lysophosphatidique (Sekimata *et al.*, 1999). Ceci est donc en accord avec l'hypothèse que *rga-5* serait une GAP pour *rho-1* puisque la double mutation chez *rga-5* et *gei-1* aggrave la létalité chez l'embryon de *C. elegans* (voir Figure 3.2).

ARAP3 qui est l'homologue humain de *rga-13*, lie *RhoA* chez les mammifères (Myagmar *et al.*, 2005 ; Krugmann *et al.*, 2006 ; Krugmann *et al.*, 2004). Encore ici, ces résultats sont en accord avec l'interaction possible (n=1) aggravante de type synergique que nous avons pu observer entre *rga-5* et *rga-13*, montrant que ces deux GAP pourraient agir de façon redondante sur la même GTPase (*RHO-1*) ou sur des voix parallèles. Il sera intéressant de tester si ces deux Rho GAP ciblent effectivement toutes les deux la même GTPase, *rho-1* chez *C. elegans*.

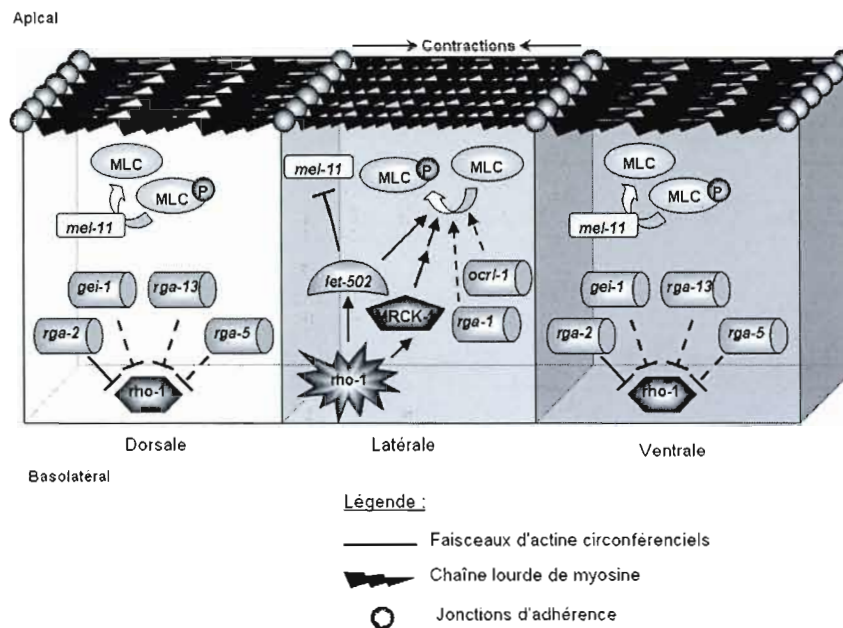


Figure 3.2 Schéma projeté de la contraction des cellules latérales de l'hypoderme lors de l'élongation de l'embryon de *C. elegans*

Les activations de voies sont matérialisées par des flèches pointues et les inactivations de voies sont matérialisées par des flèches avec une barre horizontale. Les lignes pointillées sont des hypothèses.

2. Conclusions

Nous avons identifié douze interactions génétiques entre les Rho GAP chez *C. elegans* :

- une interaction tamponnante (*ocr-1* avec *rga-5*) (n=3).
- deux interactions aggravantes de type synergique entre *srgp-1* et *ocr-1* ; et entre *rga-5* et *gei-1* (n=2).
- neuf interactions avec un faible niveau de certitude (n=1).

Quatre de ces interactions nous permettent dès à présent d'émettre des hypothèses quant à la composition de la machinerie de régulation de la GTPase RHO-1 au cours de l'élongation embryonnaire.

Nous avons démontré qu'*ocr-1* est une GAP qui agit dans une voie antagoniste à *rga-5*. Cela pourrait être aussi le cas pour *rga-1* mais le résultat reste à être confirmé. Avec

une assez bonne certitude nous pouvons dire que *gei-1* et *rga-5* sont dans des voies parallèles synergiques. Un résultat préliminaire nous a montré une interaction aggravante synergique entre *rga-5* et la GAP *rga-13* mais avec seulement une des souches portant la mutation *rga-5(ok1498)II*. La littérature nous dit que les homologues humain de *gei-1* et *rga-13* lient tous deux *RhoA*, ce qui laisse envisager soit que *rga-5* est une GAP pour *rho-1* ou alors qu'elle régule une autre GTPase dans une voie parallèle à *rho-1*.

3. Perspectives

Il reste à confirmer les résultats préliminaires (neuf interactions). Il serait intéressant de tester les ARNi des six GTPases de *C. elegans* sur le mutant *rga-5(ok1498)II*, ce qui nous permettrait de déterminer de quelle GTPase *rga-5* est spécifique.

Il faudrait également continuer à tester les 369 interactions restantes entre les Rho GAP, tout en vérifiant par séquençage la fiabilité de nos ARNi.

Le nombre impressionnant d'interactions à tester nous a poussé à mettre au point de nouvelles méthodes pour le haut débit permettant l'identification d'interactions génétiques aggravantes et tamponnantes, que nous allons voir dans la partie suivante.

QUATRIÈME PARTIE

Mise au point d'une méthode à haut débit permettant de déterminer la létalité embryonnaire
et le stade d'arrêt du développement

Comme nous l'avons vu dans le chapitre précédent, il existe 420 interactions génétiques possibles entre les Rho GAP (mutants et ARNi). Il devient donc nécessaire de mettre au point une méthode permettant d'une part de traiter aux ARNi une grande quantité de vers en même temps et d'autre part d'être capable d'analyser leur progénie afin de déterminer à quel stade du développement les œufs se sont arrêtés.

CHAPITRE 1

Traitement ARNi liquide sur nématodes transgéniques histones::GFP et analyse en haut débit

Ce protocole a été mis au point afin :

- d'adapter le traitement ARNi en liquide pour une grande quantité de vers (la méthode sera faite en plaque de 96 puits) et
- d'analyser suite aux traitements ARNi, le phénotype de létalité embryonnaire et le stade d'arrêt du développement au cytomètre en flux.

Ce protocole nous a permis de mettre au point une analyse par cytométrie en flux des œufs en utilisant des vers transgéniques histones::GFP. Puis un marquage des œufs (qui sera décrit dans la partie 2 de ce chapitre) a été mis au point afin de se libérer de la contrainte de l'utilisation de vers exprimant une protéine fluorescente.

La description de cette nouvelle méthode a fait l'objet d'un article publié dans un journal de méthodes avec comité de lecture :

Boulier E. L. and Jenna S. (2009) Genetic dissection of *Caenorhabditis elegans* embryogenesis using RNA interference and flow-cytometry. *Methods Mol Biol.* **550**:181-94.

RÉSUMÉ

L'étude du développement embryonnaire de *Caenorhabditis elegans* a été utile pour disséquer les mécanismes moléculaires contrôlant la prolifération cellulaire, la polarisation cellulaire, la différenciation cellulaire et les événements morphogéniques également impliqués dans l'embryogenèse chez l'humain. La force de cet organisme pour la recherche développementale consiste en sa pertinence pour le développement de criblage génétique à haut débit. De plus sa morphologie simple et sa transparence sont particulièrement adaptées à l'étude des processus de développement au niveau d'une seule cellule. Les criblages génétiques à grande échelle ciblant le développement embryonnaire chez *C. elegans* sont habituellement peu sensibles et non-quantitatifs.

Dans ce chapitre nous détaillons une nouvelle approche permettant la dissection génétique de l'embryogenèse de *C. elegans* de manière quantitative et semi-automatique. Cette approche se base sur l'ARNi et la cytométrie en flux permettant la mesure de phénotypes discrets de létalité embryonnaire et l'étape d'arrêt des embryons.

Mots clés : *Caenorhabditis elegans*; ARNi; haut débit; développement embryonnaire; criblage génétique; COPAS Biosort; cytométrie en flux.

1. Introduction

In multicellular organisms, embryonic development involves intense cell proliferation followed by cell differentiation and morphogenic events leading to organ formation (Figure 1.1). Molecular machins controlling these developmental events appear to be well conserved throughout evolution (Chisholm and Hardin, 2005 ; Gonczy and Rose, 2005 ; Muller and Bossinger, 2003). The soil nematode *C. elegans*, with its low number of cells (a thousand cells in adults), its simple morphology and invariable developmental pattern has been used for decades as an animal model to identify the genes controlling embryonic development (Chisholm and Hardin, 2005 ; Gonczy and Rose, 2005). The sequencing of *C. elegans* genome, the identification of RNA interference as a powerful tool to reduce gene

expression in living organisms, and the construction of genome-wide RNAi libraries have significantly accelerated this discovery process.

Large-scale RNAi screens using embryonic lethality as a phenotypic readout involve visual inspection of RNAi-treated populations and are usually not quantitative (Kamath *et al.*, 2003 ; Rual *et al.*, 2004 ; Simmer *et al.*, 2003 ; Maeda *et al.*, 2001). Consequently, these approaches while being powerful to identify essential genes associated with highly penetrant embryonic lethality, fail to identify phenotypes with low penetrance and are poorly amenable to identification genetic interactions that require quantitative data.

The recent development and commercialization of the flow-cytometer COPAS Biosort (Complex Object Parametric Analyzer and Sorter) by Union Biometrica provides the necessary technology for the development of high-throughput and quantitative RNAi screening for embryonic lethality. The COPAS Biosort enables automated quantitative analyses of nematode size and fluorescent emission. It is interfaced with a ReFLx sampler module that enables the analysis of populations incubated in 96-well plates in a semi-automated manner.

The procedure detailed in this chapter aims to analyze in a quantitative and semi-automated manner embryonic lethality associated with nematode populations submitted to RNAi treatment. It aims also to provide a relative staging of arrested embryos and consequently to cluster genes based on their requirement in early or late stages of the embryonic development. To do so, we use a *C. elegans* transgenic strain expressing a translational fusion of Histones with a green fluorescent protein (GFP) throughout embryonic development. Embryos expressing this fusion protein have a GFP emission that is proportional to the number of cells they contain (Figure 1.1). GFP emission could then be used to discriminate early embryos (with low GFP emission) from late embryos (with high GFP emission). To identify genes whose functions are required for embryonic development, transgenic animals are submitted to RNAi using feeding protocol and their progeny analysed for embryonic lethality. Counting of L1 versus dead embryos using the COPAS Biosort is used to estimate the average embryonic lethality associated with RNAi treatments. The distribution of GFP emission per dead embryos is used to discriminate genes involved in early versus late developmental stages.

These two quantifications could be used to identify genetic interactions using double genetic perturbations through RNAi (Lehner *et al.*, 2006a ; Lehner *et al.*, 2006b). This approach could also be used as a first screen to cluster genes based on their involvement in early or late developmental stages.

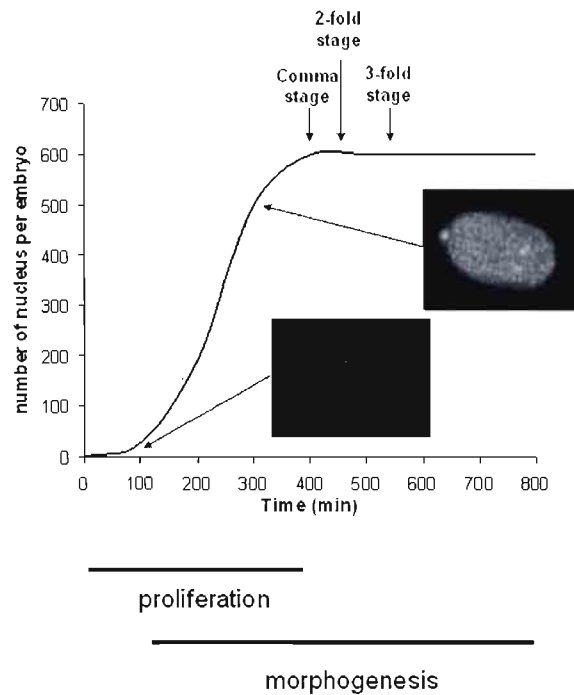


Figure 1.1 Embryo staging based on fluorescent emission from animals expressing Histone::GFP translational fusion
 Are represented the number of cells per embryos at the different stages of *C. elegans* embryonic development (Chisholm and Hardin, 2005). Pictures of embryos at early and late embryonic stages are recorded using fluorescent microscopy and digital camera.

2. Materials

2.1. Generation and Maintenance of RNAi-Expressing Bacterial Clones

1. The ORFeome-based library

Commercially available: open biosystems, <http://www.openbiosystems.com>.

The *C. elegans* ORFeome-RNAi v1.1 library represents ~55% of the predicted genes with 11,804 RNAi clones comprising the *C. elegans* ORF-RNAi feeding library. High throughput-recombinational cloning protocols were used to transfer the *C. elegans*

ORFeome v1.1 into the pL4440-dest-RNAi feeding vector using recombinational cloning methods (Gateway cloning, Invitrogen) (Rual *et al.*, 2004). These constructs are transformed into bacterial strain HT115 as described (Kamath *et al.*, 2003).

2. Genomic DNA-based library

Commercially available: GeneService, <http://www.geneservice.co.uk>.

To generate this library *C. elegans* genomic fragments were PCR amplified using Research Genetics GenePairs, cloned into the EcoRV site of vector L4440 (Timmons and Fire, 1998), and transformed into bacterial strain HT115 as described (Kamath *et al.*, 2003). The whole genome library consists of 16,757 bacterial strains, which cover 87% of *C. elegans* genes.

3. Tetracycline HCL (Bioshop): 5 mg/ml in ethanol 95 % and store at -20°C.
4. Ampicillin Sodium Salt (Bioshop): 10 mg/ml in water and store at -20°C
5. LB medium: 10 g/L NaCl, 10 g/L Bactopeptone, 5 g/L yeast extract, 2 pearls/L NaOH ; autoclave to sterilize.

2.2. Transformation of HT115 Bacteria with RNAi Coding Vector

- *E.coli* HT115(DE3) strain.

Genotype: *F⁻, mcrA, mcrB, IN(rrnD-rrnE)1, lambda⁻, rnc14::Tn10*.

Description: This strain is RNase III deficient and is able to express T7 polymerase upon IPTG induction. T7 polymerase gene expression is driven by the lacUV5 promoter that is IPTG inducible. *Rnc14* encodes RNase III that is disrupted by *Tn10* and consequently unable to degrade the dsRNA expressed *in vivo*. *Tn10* carries a tetracycline resistant gene.

- SOC medium: 20 g/L Bactopeptone ; 5 g/L Yeast Extract ; 0.5 g/L NaCl ; 10 ml of 250 mM KCl ; adjust pH to 7 ; autoclave to sterilize.
- LB agar medium: 10 g/L NaCl ; 10 g/L Agar ; 10 g/L Bactopeptone ; 5 g/L Yeast Extract ; 2 palette/L NaOH ; autoclave to sterilize.
- Square bottom 96-wells Block polypropylene (Corning Incorporated).
- 96-well PCR plates (Corning Incorporated).
- Breathable films (VWR international).

- 2 mm diameter Glass beads, sterile (VWR international).

2.3. RNAi Treatment of Histone-GFP Expressing Animals

- Worm strain RW10006 can be obtained from the Caenorhabditis Genetics Center; University of Minnesota (<http://www.cbs.umn.edu/CGC/order.html>):
Genotype: *unc-119(ed3) I; ruls32III[unc-119(+) + pie-1::GFP::H2B]; zuls178 V[unc-119(+) + his-72(1 kb)::HIS-72::GFP]*.
Description: These animals express a translational fusion of the histone with the green fluorescent protein (GFP). Expression is ubiquitous in embryo, and also detected in adult germline and several adult somatic cells.
- NGM-agar: 3 g/L NaCl ; 16 g/L Agar ; 2.5 g/L Bacto-peptone ; autoclave and add 1 mM MgSO₄ ; 1 mM CaCl₂ ; 1 mM Phosphate buffer and 5 µg/ml cholesterol.
- NGM liquid 3 g/L NaCl ; 2.5 g/L Bacto-peptone ; autoclave and add 1 mM MgSO₄ ; 1 mM CaCl₂ ; 1 mM Phosphate buffer and 5 µg/ml cholesterol.
- Hypochlorite buffer 1X : 0.4 M Hypochlorite ; 0.5 M NaOH.
- TY: 5 g/L Bacto-peptone, 2.5 g/L Yeast extract ; autoclave to sterilize.
- M9: 12.8 g/L Na₂HPO₄·7H₂O ; 3 g/L KH₂PO₄ ; 5 g/L NaCl ; 0.25 g/L MgSO₄·7H₂O ; autoclave to sterilize.
- Phosphate Buffer 1M: 129.25 g/L KH₂PO₄ ; 51.75 g/L K₂HPO₄ ; adjust the pH at 6 and filter to sterilize.
- IPTG (Bioshop) : prepare 1 M solution and store at -20°C.
- Petri 100 mm diameter plates (Sarstedt).
- 6-wells Cell Culture Flat Bottom plate with Lid, sterile (Corning Incorporated).
- Tissue culture 96-wells plate Flat Bottom with Lid, sterile (Sarstedt).

2.4. Preparation of Eggs from RNAi Treated Animals

- Hypochlorite buffer 2X : 0.8 M Hypochlorite ; 1 M NaOH.
- Acroprep™ 96-filter plate ; 1.2 µm Supor NTRL, 350 µl well (Pall Life Science).

2.5. Analysis of HIS2::GFP Animals Progeny using Flow Cytometry

- Flat Bottom 96-wells Microtest Plate, sterile (Sarstedt).
- SDS 1%: dissolve 1 g of SDS in 100 ml of mQ water store at room temperature.
- Sheath buffer: This buffer is commercially available (Union Biometrica, Boston, USA). This buffer of unknown composition is an aqueous based reagent containing surfactant.
- Cleaning reagent: This buffer is commercially available (Union Biometrica, Boston, USA). This buffer of unknown composition is an aqueous based reagent containing surfactant.
- Beads GP control particles: This buffer is commercially available (Union Biometrica, Boston, USA). These particles used as control, are 42 μm fluorescent latex beads.

3. Methods

3.1. Generation and Maintenance of RNAi-Expressing Bacterial Clones

Double stranded RNA (dsRNA) inducing RNAi can be introduced in living nematodes using different experimental approaches: (i) through injection in animal gonads, (ii) through soaking of animals in dsRNA solution; or (iii) through feeding the animals with bacteria expressing the dsRNA. The later approach has been adopted by the *C. elegans* community to develop genome-wide RNAi screenings. Two RNAi-by-feeding libraries are currently available to the scientific community. They have been generated through PCR-amplification of genomic DNA fragments (Kamath *et al.*, 2003) or through recombination in RNAi-by-feeding vectors of full-length ORFs of the *C. elegans* ORFeome v1.1 library (Rual *et al.*, 2004 ; Reboul *et al.*, 2003). These two RNAi libraries partially overlap and when combined cover 17,201 genes corresponding to approximately 86% of the predicted worm genome⁴.

⁴ For most genes, dsRNA stretches from 200 to 1000 nucleotides or longer appear to effectively induce interference. However, some specific gene segments are ineffective at inducing interference. Consequently, RNAi treatment should be tried using several segments of a gene. Some additional cloning of cDNA segment into RNAi-by-feeding vectors is consequently required and could complement existing resources. Detail procedure in how generating these constructs have been described elsewhere (Jenna and Chevet, 2007).

The *C. elegans* RNAi feeding clones are usually provided as *E. coli* bacterial stocks in LB broth containing 8% glycerol, Ampicillin at a concentration of 100 $\mu\text{g/ml}$, and Tetracycline at a concentration of 12.5 $\mu\text{g/ml}$. They can be stored at 4 °C for a week or grown to generate fresh glycerol stocks as detailed in this section. They could also be provided as purified pL4440-RNAi vectors. These construction should then be transformed in HT115 bacteria (Timmons *et al.*, 2001) as detailed here.

RNAi coding vectors are variants of the original pL4440-RNAi vector (Timmons and Fire, 1998) that contain the coding sequence of interest between two T7 promoters. This vector contains a gene of resistance to the Ampicillin.

The efficiency of RNAi-by-feeding procedure requires that bacteria could express and accumulate a large amount of dsRNA. For this reason RNAi mediating constructs are transformed in an engineered *E. coli* HT115(DE3) strain that are deficient for RNase and engineered to express the T7 RNA polymerase required for dsRNA synthesis (Timmons *et al.*, 2001).

1. Competent cells are prepared using classical Calcium Chloride procedure and dispensed in 96-well PCR plates (50 μl of bacteria per well) prior to freezing at -80 °C.
2. Competent cells are thawed on ice and incubated with 100 ng of pL4440 plasmids containing the coding sequence of interest⁵.
3. Bacteria are incubated with DNA in a thermocycler for 30 min at 4 °C, for 90 sec at 42 °C and for 10 min at 4 °C.
4. Bacteria are then transferred to sterile 2ml 96-well blocks containing 300 μl of SOC medium. Blocks are sealed with breathable film and incubated for 30 minutes at 37°C upon agitation (600 rpm in orbital microplate shaker).
5. Bacteria are centrifuged at 3000 g for 10 min at RT, 260 μl of culture medium is removed from the wells.
6. Bacteria are resuspended in remaining medium and plated using sterile glass beads in 6-well plates freshly poured with LB-agar plates containing 100 $\mu\text{g/ml}$ of Ampicillin and 12.5 $\mu\text{g/ml}$ of Tetracycline.
7. Seeded plates are incubated at 37°C upside-down over-night.

⁵ HT115 bacteria are extremely fragile and require particular care such as avoiding unnecessary pipetting.

8. A pool of 8 colonies for each construct are grown in 500 μ l of LB medium containing 100 μ g/ml Ampicillin and 12.5 μ g/ml Tetracycline overnight at 37°C.
9. 500 μ l of 40% glycerol/LB buffer is added to the culture, mixed by vortexing and stored at -80°C for periods up to 2 years.

3.2. RNAi Treatment of Histone-GFP Expressing Animals

As detailed in the introduction transgenic animals expressing a translational fusion of Histone with GFP are used to: (i) calculate the embryonic lethality associated with each genetic perturbation; (ii) to stage arrested embryos⁶. The procedure detailed in this section is illustrated in Figure 1.1.

Each RNAi experiment is performed in triplicate, and each plate contains the two following controls: (i) worms fed with HT115(DE3) bacteria or (ii) HT115(DE3) bacteria transformed with pL4440-eGFP vector. These two conditions correspond to negative and positive RNAi controls respectively. Using this protocol, RNAi against 30 different genes can be tested per 96-well plates and up to 5 plates can be processed per person and per day. A thousand genes could then be tested using this approach per week.

3.2.1. Synchronization of Nematode Population

In opposition to larvae and adults, embryos are protected against hypochlorite treatment by their egg shells. This treatment is then used to purify embryos from a non-synchronized population containing a majority of adults.

⁶ Some mutations have been demonstrated to increase sensitivity to dsRNA treatment: *eri-1(mg366)* IV and *rrf-3(pk1426)* II. RNAi phenotypes in *rrf-3(pk1426)* II genetic background may be stronger and more closely resemble a null phenotype as compared to wild-type phenotype. However, this mutation was shown to silence transgenes and is therefore not recommended to examine GFP expression in transgenic animals. However, the generation of transgenic animals expressing Histone::GFP fusion proteins in the genetic background of *eri-1(mg366)* IV mutation could constitute an excellent model to increase the penetrance of RNAi-induced phenotypes.

1. Nematodes are floated from ten 100 mm-NGM agar plates containing a large amount of adult hermaphrodites using 10 ml of M9 buffer⁷.
2. Nematodes are sedimented in 15 ml conical tube at 900 g at room temperature.
3. They are then incubated for 4 minutes in hypochlorite buffer 1X, washed 5 times and resuspended in 20 ml of sterile M9 buffer and dispensed in a 100 ml glass Erlenmeyer.
4. Embryos are incubated for 16 hours at 22°C upon agitation (220 rpm orbital shaking)⁸. During this incubation, eggs will hatch and larvae will arrest at L1 stage due to the lack of food.
5. In order to obtain synchronized L3 larvae, L1 larvae are incubated for 1 day at 18°C in about 500 μ l of NGM liquid per 50 worms containing one fifth (volume/volume) of a saturated culture of HT115 bacteria. Incubation is carried out in a 100 ml glass Erlenmeyer upon agitation (220 rpm orbital shaking)⁹ (Figure 1.2).

⁷ Embryos laid on the NGM agar plate will stick to the plate and could not be collected by floatation. Eggs could be detached from the plate through gentle scraping of its surface with a finger (with gloves).

⁸ Embryos need oxygenation for proper development. Lack of oxygenation after hypochlorite treatment will result in major embryonic lethality.

⁹ Culture could be delayed through incubation at 15°C for 1 day and a half.

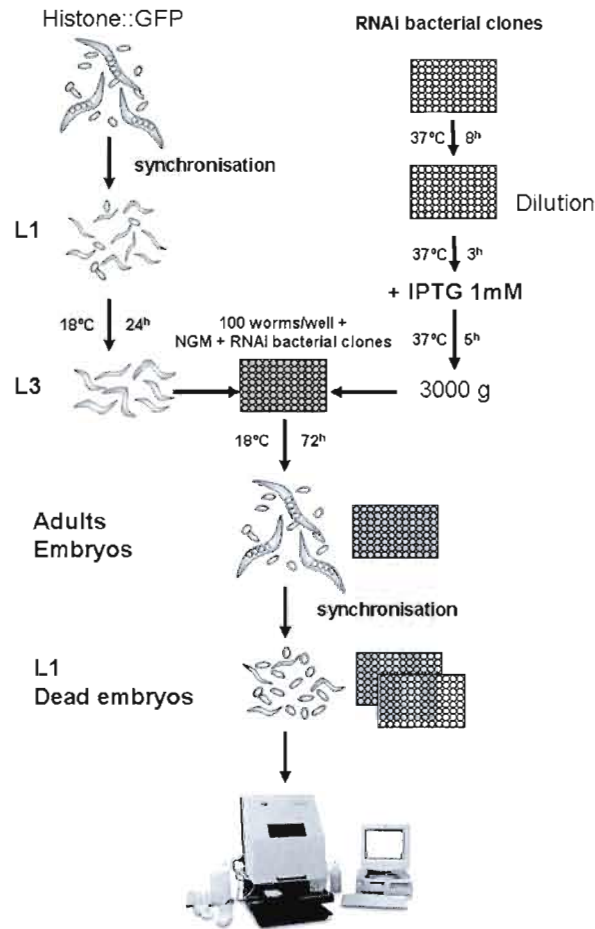


Figure 1.2 Diagram of experimental procedure used to study embryonic development using RNAi and flow-cytometry

3.2.2. Induction of ds RNA Synthesis by HT115 Bacterial Clones

1. Flat bottom 96-wells blocks containing 1 ml of LB medium; 100 $\mu\text{g/ml}$ Ampicillin and 12.5 $\mu\text{g/ml}$ Tetracycline are inoculated with HT115 clones transformed with RNAi constructions, sealed with a breathable film and grown for 8 hours at 37°C upon agitation (220 rpm, microplate orbital shaking).

2. Bacterial cultures are mixed with a pipette and 20 μ l are transferred to fresh 96-well blocks containing 750 μ l of NGM liquid medium containing 100 μ g/ml Ampicillin¹⁰.
3. Bacterial cultures are incubated at 37°C for 3 hours upon agitation (220 rpm, orbital microplate shaker), and synthesis of double strand RNA induced for 5 hours at 37°C after adjunction of 1 mM of IPTG to bacterial culture.
4. Bacteria are centrifuged at 3000 g for 20 min at room temperature. Culture medium is removed from the wells and the bacterial pellet re-suspended with 200 μ l of NGM liquid medium. 100 μ l of this culture is transferred to flat bottom 96-well plates and the remaining culture sealed with a plastic mat and stored at 4°C (see Figure 1.2).

3.2.3. Treatment of Synchronized Animals with RNAi

1. Concentration of L3 larvae in synchronized population is estimated in 5 and 10 μ l of worm suspension using dissecting microscope.
2. Concentration of the worms is adjusted to 4 worms per microliter with M9 buffer.
3. 25 μ l of worm suspension (corresponding to one hundred L3 larvae) are dispensed per well of plates containing RNAi expressing bacteria¹¹.
4. Animals are submitted to RNAi treatment for 72 hours at 18°C without agitation¹² (see Figure 1.2).

¹⁰ The *Tn10* transposon interrupting RNase III gene in HT115 carries a tetracycline resistance gene. Therefore, bacteria should be subjected to tetracycline selection (12.5 μ g/ml) to maintain the RNase deficiency. However, the presence of tetracycline in worm culture medium has been reported to reduce RNAi efficiency (Kamath *et al.*, 2001). The transposon being quite stable, we recommend to avoid using tetracycline in NGM culture medium during RNAi treatment of nematodes.

¹¹ Nematodes are dispensed in plates using multichannel pipettes with 200 μ l tips with extremity cut to avoid damaging the nematodes.

¹² Check every day if the worms have enough food. To avoid starvation 50 μ l of induced bacteria stored at 4°C (see section 3.2.2-4) could be added to the culture.

3.2.4. Preparation of Embryos from RNAi-Treated Animals

1. Nematodes are sedimented at 900 g for 3 minutes and 50 μ l of supernatant discarded¹³.
2. 50 μ l of hypochloride solution 2X is added to each well and plate incubated for 2 to 3 minutes at room temperature under a dissecting microscope.
3. When adults rupture from the effect of the treatment, suspensions are filtered through Suport membrane using 96-well filter plates upon vacuum.
4. Embryos preparations are washed 4 times with 200 μ l of M9 buffer in the filter plate, resuspended in 150 μ l of M9 and dispensed in clean and sterile flat bottom 96-wells plates. Each triplicate of experimental condition should be separated by 3 empty wells that will be used to was the ReFLx. Embryos are incubated overnight at 22°C without agitation. This allows the eggs to hatch (see Figure 1.2).

3.3. Analysis of HIS2::GFP Animals Progeny using Flow Cytometry.

The COPAS Biosort is operated following Union Biometrica instructions. The standard COPAS Biosort includes a 670 nm red diode laser which is used to measure the axial length (time of flight, TOF) and the optical density of objects. It contains also a multi-line argon laser for fluorescent excitation. The standard instruments have an extinction detector and three PMT fluorescence detectors which can be used to detect fluorescence emissions in the green, yellow, and red regions of the spectrum. To measure GFP emission, select the 488 nm excitation filter for the Multi-Line Argon-Ion Laser, and consider the fluorescent emission detected between 498 and 522 nm by the PMT1 (Green channel).

¹³ Any food that may have been added to the well during the RNAi treatment have to be considered to estimate the total volume contained per well. The amount of hypochlorite solution 2X has then to be adjusted accordingly to obtain a 1X final concentration in the next experimental step.

3.3.1. Qualibration of the COPAS Biosort and Reflx Sampler

1. The flow rate should be adjusted to 9-10 ml/min. To adjust the flow rate to appropriate level, increase or decrease the sample pressure.
2. To calibrate the COPAS, select "run control particles" in tool menu, put the GP beads in the Cup. Click on Acquire button to begin sheath and sample flow. We expect to have a Mean related to the bead distribution of 21 ± 6 and a coefficient of variation around that mean (C.V.) ≤ 11 ¹⁴.
3. Setup of all parameters for fluorescent and TOF measurement and detection as follow:
 - Scales for TOF, Ext, Green, Yellow and Red should be set to 256
 - Gain should be set as follow:

	Signal	Integral
Ext	100	100
Green	150	150
Yellow	150	150
Red	150	150

- PMT Control should be set as follow:

Green	700
Yellow	700
Red	900

¹⁴ If the C.V. is > 11 and the Mean is > 27 try to clean the tubules by clicking several times on the Clean button.

3.3.2. Analysis of the L1 and Eggs Populations using the COPAs ReFLx Sampler

Prepare the plate as follow:

1. Fill the 3 washing wells with either 150 μ l of SDS 1 % (first well) and sheath buffer (second and third wells). The presence of ionic detergent in the first washing well avoid plugging of the COPAS tubes by embryos.
2. Put the plate on the right part of the ReFLx sample module, click "Sample" on the COPAS command interface and save data file as .txt.

3.3.3. Calculation of the Embryonic Lethality

The COPAS biosort qualibrate animals and embryos for each condition through measurement of the TOF (Figure 1.3 C). As shown in Figure 1.3, embryos and L1 Larvae are identified as objects with TOFs ranging from 24 to 36 (Emb, Figure 1.3 A) and from 41 to 100 (L1, Figure 1.3 B) respectively. This measurement allows the calculation of the percentage of embryonic lethality that is expressed as the percentage of dead eggs (Emb) over the total number of objects (Emb + L1). As shown in Figure 1.3 D, control (RNAi) and egfp (RNAi) conditions show an Embryonic lethality that may reach 5 to 20 % and that correspond to embryonic lethality resulting from hypochlorite treatment of control animals¹⁵.

¹⁵ Reducing to a minimum this level of embryonic lethality will improve the sensitivity of the technique. Consequently, batch of experiment with a baseline Embryonic lethality superior to 20% should not be considered for analysis.

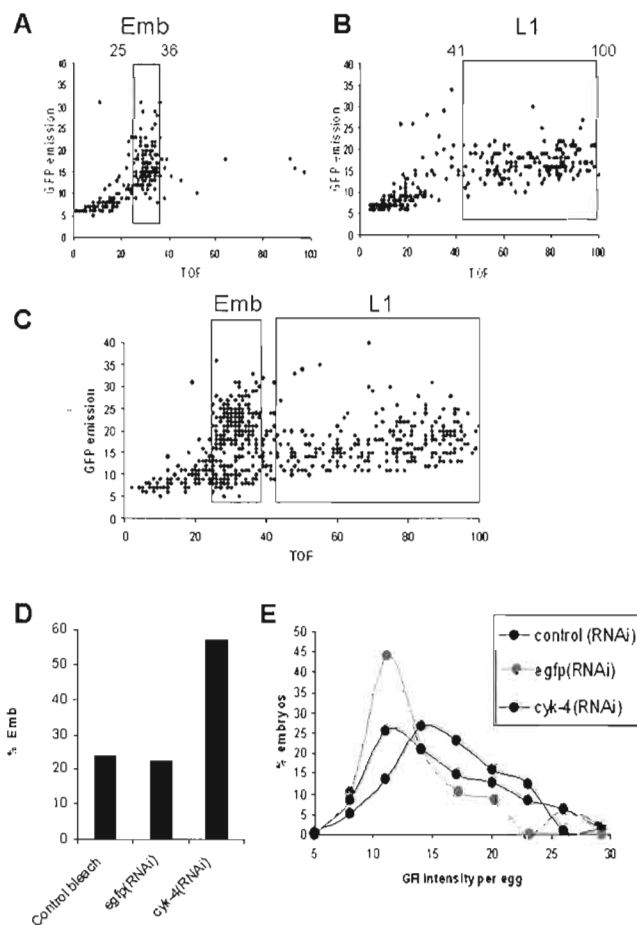


Figure 1.3 Flow-cytometry analysis of the progeny of RNAi treated-animals. Example of graph plot representing GFP emission versus TOF (time of flight) of freshly prepared embryos (A); of synchronized L1 larvae (B) and of the progeny of animals treated with RNAi against essential genes (C). Are also represented the percentage of embryonic lethality (D) and the distribution of embryos based on GFP emission (E) of Histone::GFP expressing animals fed with HT115 (control (RNAi)), of animals treated with RNAi against *egfp* (*egfp* (RNAi)) and of animals treated with an RNAi against *cyk-4* (*cyk-4* (RNAi)).

3.3.4. Identification and Representation of the Embryonic Lethality Profiles.

Drawing the distribution of eggs (TOF between 25 and 36) for different windows of fluorescence emission ranging from 5 to 50 (arbitrary unit, using parameters set in section 3.3.1) allow us to identify RNAi treatments inducing an accumulation of early or late embryos when compared to control (RNAi) (Figure 1.3 E). The shift to low fluorescence of

egg distribution for *egfp* (RNAi) condition shows the efficiency of RNAi treatment for each experiment¹⁶.

As an example of the efficiency of the technique *cyk-4* (RNAi) is shown by our technique to induce an arrest of embryos in early embryonic stages (Figure 1.3 E). This confirms published data, showing the involvement of *cyk-4* in the control of the first division (stage 1-2 cells) (Jantsch-Plunger et al., 2000).

¹⁶ Experiment should not be considered for analysis if there is no significant difference between distributions corresponding to *egfp* (RNAi) and control (RNAi) conditions.

CHAPITRE 2

Optimisation du marquage des œufs à l'iodure de propidium

La méthode précédente a l'inconvénient de ne pas permettre de produire des doubles mutants fluorescents pour deux Rho GAP. En effet, les mutants pour les Rho GAP ne sont pas fluorescents comme le transgénique histone::GFP. La génération de mutants transgéniques GFP est possible mais très laborieuse en terme de temps et de réussite. Il devient donc nécessaire de marquer les œufs pour les rendre fluorescents et donc détectables par le cytomètre en flux (le COPAS) et de permettre le développement de criblage à haut débit utilisant cette technique.

1. Matériel et Méthodes

1.1. Préparation des œufs par traitement à l'hypochlorite de sodium

La souche de transgéniques RW10006 utilisée est disponible chez Caenorhabditis Genetics Center; University of Minnesota (<http://www.cbs.umn.edu/CGC/order.html>). Cette souche est un transgénique histone::GFP qui émet une fluorescence verte due à la GFP lorsque cette dernière est excitée.

Une grande quantité de vers est cultivée sur NGM agar¹⁷ avec des OP50 et lorsque les pétris contiennent une majorité d'adultes ils sont javellisés (avec un tampon contenant 0,4 M d'hypochlorite de sodium et 0,5 M NaOH) afin de ne récupérer que les œufs. Les œufs sont lavés plusieurs fois au tampon M9¹⁸ puis sont resuspendu dans 500 μ l de M9. Les œufs sont ensuite fixés et colorés suivant différents protocoles.

¹⁷ Composition du NGM-agar: 3 g/L NaCl ; 16 g/L Agar ; 2.5 g/L Bactopepetone ; autoclaver et ajouter 1 mM MgSO₄ ; 1 mM CaCl₂ ; 1 mM Phosphate buffer and 5 μ g/ml cholesterol. Le tampon phosphate de 1M contient : 129,25 g/L KH₂PO₄ ; 51,75 g/L K₂HPO₄ ; son pH est ajusté à 6 et le tampon est filtré pour être stérilisé.

¹⁸ Composition du tampon M9 : 12,8 g/L Na₂HPO₄.7H₂O ; 3 g/L KH₂PO₄ ; 5 g/L NaCl ; 0,25 g/L MgSO₄.7H₂O ; autoclaver pour stériliser.

Les œufs sont alors observés et photographiés à l'aide d'un microscope à fluorescence (Leica DM 5500B) muni d'une caméra (Leica DF C350 FX) avec un logiciel d'imagerie (Leica LAS AF).

1.2. Optimisation de la fixation des œufs de *C. elegans*

1.2.1. Fixation au méthanol (10 %) à -20°C

1. Les œufs sont fixés pendant 15 minutes à -20°C dans 10 volumes de méthanol froid. Le surnageant est éliminé après une centrifugation de 3 min à 900 g.
2. Les œufs sont réhydratés 30 minutes dans 1 ml de PBS 1X¹⁹ à température pièce. Le surnageant est éliminé en ne laissant que 100 µl, après une centrifugation de 3 minutes à 900 g.
3. Le marquage est fait à l'abri de la lumière, pendant 10 minutes à température pièce avec 100 µl de tampon Tris-HCl Triton X-100²⁰ contenant 1,5 ng/µl d'iodure de propidium²¹ et de DAPI²² 1 µg/ml. Le surnageant est éliminé après une centrifugation de 3 minutes à 900 g. Les œufs sont lavés avec du tampon Tris-HCl Triton X-100.
4. Les œufs sont montés entre une lame (Premiere®) et une lamelle (Fisher) avec 20 µl de Moviol²³. Les lames sont séchées à l'abri de la lumière à température pièce pendant 16 h.

1.2.2. Fixation au méthanol (10 %) à -80°C

Dans ce protocole la fixation au méthanol 10 % est faite pendant 10 minutes à -80°C, suivi d'une décongélation de 10 minutes à température pièce, et d'une autre incubation à -20°C pendant 15 minutes. Les œufs sont réhydratés et marqués de la même manière que le protocole précédent.

¹⁹ Composition du PBS 1X : 137 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 4,3 mM Na₂HPO₄ ; 1,4 mM KH₂PO₄.

²⁰ Composition du Tris-HCl triton : Tris-HCl 100 mM pH 7.4, Triton X-100 1 %.

²¹ Solution stock de l'iodure de propidium : 1mg/ml, conserver à 4°C à l'abris de la lumière.

²² Solution stock du DAPI : 1 mg/ml dans l'eau, conserver à -20°C à l'abris de la lumière.

1.2.3. Fixation au méthanol (100 %) à -20°C

1. Les œufs sont mis dans 100 μ l d'eau et sont congelés à -80°C 10 minutes et décongelés à température pièce pour créer des pores dans la coquille. Le surnageant est éliminé après une centrifugation de 3 minutes à 900 g.
2. Les œufs sont fixés 10 minutes dans 100 % de méthanol froid à -20°C.
3. La réhydratation est faite dans du tampon PBS pendant 30 minutes à température pièce.
4. Les œufs sont perméabilisés 5 minutes dans du tampon Tris-HCl Triton X-100. Le surnageant est éliminé après une centrifugation de 3 minutes à 900 g.
5. Le marquage des œufs est fait à l'abri de la lumière, à température pièce pendant 10 minutes avec 100 μ l de tampon Tris-HCl Triton X-100 contenant 0,2 ng/ μ l d'iodure de propidium et de DAPI 1 μ g/ml. Le surnageant est éliminé après une centrifugation de 3 minutes à 900 g. Les œufs sont lavés trois fois 2 minutes dans 1 ml de tampon Tris-HCl Triton X-100.
6. Les œufs sont montés sur lame-lamelles avec 20 μ l de Moviol. Les lames sont séchées à l'abri de la lumière à température pièce pendant 16h.

1.2.4. Fixation au fixateur Ruvkun

Dans ce protocole la fixation est faite pendant 10 minutes à -80°C avec du Ruvkun. Les œufs sont dégelés 10 minutes à température pièce et réhydratés pendant 2 minutes dans du tampon Tris-HCl Triton X-100. Le surnageant est éliminé en ne laissant que 100 μ l, après à une centrifugation de 3 minutes à 900 g. Les œufs sont marqués de la même manière que le protocole précédent.

²³ Composition du Moviol : 6 g AR glycérol ; 2,4 g Moviol 4-88 ; 6 ml d'eau ; 12 ml 0,2 M Tris HCl pH 8,5 ; dissoudre à 50°C ; centrifuger à 5000 g 15 minutes à température pièce ; filtrer ; ajouter de la phénylènediamine pour obtenir une couleur jaune paille ; conserver à -20°C.

1.2.5. Fixation au formaldéhyde (4%)

Dans ce protocole, les œufs sont fixés avec du formaldéhyde à 4 % pendant 10 minutes à -80°C. Les œufs ont subi deux cycles de décongélation et congélation de 10 minutes à température pièce et à -80°C. Les œufs sont lavés 3 fois pendant 2 minutes dans du tampon Tris-HCl Triton X-100. Enfin ils sont marqués comme dans le protocole précédent.

1.2.6. Combinaison de deux fixateurs : formaldéhyde (1 ou 2 %) et méthanol (100 %) ou éthanol (70 ou 95 %)

1. Les œufs contenus dans 500 μ l de M9 sont incubés 5 minutes à 4°C.
2. Les œufs sont fixés avec 1 ou 2 % de formaldéhyde froid pendant 1 heure à 4°C. Ils sont lavés 3 fois dans du PBS froid et incubés dans 500 μ l de 100 % de méthanol froid ou d'éthanol froid à 70 % ou à 95 % pendant 10 minutes à -20°C, auxquels 500 μ l de PBS sont ajoutés suivit d'une incubation de 10 minutes. Le surnageant est éliminé après une centrifugation de 3 minutes à 900 g.
3. Les œufs sont réhydratés dans 1 ml de PBS pendant 30 minutes à température pièce.
4. La perméabilisation se fait dans le tampon Tris-HCl Triton X-100 pendant 5 minutes.
5. L'ARN est éliminé par une incubation de 30 minutes à 37°C dans 100 μ l de Tris-HCl Triton X-100 contenant 200 μ g/ml de RNase (Bioshop). Le surnageant est éliminé après une centrifugation de 3 minutes à 3000 rpm.
6. Le marquage est fait pendant 10 minutes à température pièce et à l'abri de la lumière avec 100 μ l de tampon Tris-HCl Triton X-100 contenant de l'iodure de propidium 1 ng/ μ l et du DAPI 1 μ g/ml. Le surnageant est éliminé après une centrifugation de 3 minutes à 3000 rpm. Les œufs sont lavés dans 1 ml de tampon Tris-HCl Triton X-100.
7. Les œufs sont montés sur lame-lamelles avec 20 μ l de Moviol. Les lames ont séchés à l'abri de la lumière à température pièce pendant 16 h.

1.2.7. Optimisation de la concentration en formaldéhyde pour la fixation des œufs

1. Les œufs contenus dans 500 μ l de M9 sont incubés 5 minutes 4°C.
2. Les œufs sont fixés dans un tampon de PBS contenant 1, 2, 3 ou 4 % de formaldéhyde froid pendant 1 heure à 4°C. Ils sont lavés 3 fois dans du PBS 1 % Triton X-100.
3. La perméabilisation se fait dans 1 ml de PBS 1% Triton X-100 contenant 5 % de sérum bovin pendant 30 minutes à température pièce.
4. L'ARN est éliminé par une incubation de 30 minutes à 37°C dans 100 μ l de PBS 1 % Triton X-100 contenant 200 μ g/ml de RNase. Le surnageant est éliminé après une centrifugation de 3 min à 3000 rpm.
5. Le marquage se fait à l'abri de la lumière 10 minutes à température pièce dans 100 μ l de tampon PBS 1 % Triton X-100 contenant 1 ng/ μ l d'iodure de propidium et DAPI 1 μ g/ml. Ils sont lavés 3 fois dans du PBS 1 % Triton X-100.
6. Les œufs sont montés sur lame-lamelles avec 20 μ l de Moviol. Les lames ont séchés à l'abri de la lumière à température pièce pendant 16 h.

1.3. Optimisation de la perméabilisation à la chitinase

Nous avons voulu perméabiliser les coquilles des œufs et avons trouvé dans la littérature la possibilité de le faire grâce à la chitinase (Bazzicalupo *et al.*, 1980). Nous avons donc inséré une étape de traitement à la chitinase dans notre protocole, avant la fixation au formaldéhyde.

1. Les œufs contenus dans 500 μ l de M9 sont incubés 5 minutes 4°C. Ils sont lavés 4 fois dans du M9 et une fois dans du PBS 0,1% Triton X-100
2. Les œufs sont fixés dans un tampon de PBS contenant 1, 2, 3 ou 4 % de formaldéhyde froid pendant 1 heure à 4°C. Ils sont lavés 3 fois dans du PBS 1% Triton X-100).
3. La perméabilisation est faite pendant 15 minutes à température pièce avec des trois concentrations de chitinase (Bioshop), 0 ; 0,1 et 0,5 mg/ml.
4. La fixation est faite à 4°C pendant 1 heure dans du PBS 0,1 % Triton X-100 et 1 ou 2 % de formaldéhyde. Les œufs sont lavés trois fois dans du PBS 1 % Triton X-100 froid.

5. Les œufs sont perméabilisés 30 minutes dans du PBS 1 % de Triton X-100 et 5 % de sérum à température pièce.
6. L'ARN a été éliminé par incubation dans 100 μ l PBS 1% Triton X-100 contenant 200 μ g/ml RNase pendant 30 minutes ou une heure à 37°C. Les œufs sont rincés dans 300 μ l de PBS 1% Triton X-100
7. Les œufs sont marqués à l'abri de la lumière 10 minutes à température pièce dans 100 μ l de tampon PBS 1% Triton X-100 contenant 1 ng/ μ l d'iodure de propidium et DAPI 1X. Les œufs sont lavés 3 fois dans du PBS 1% Triton X-100.
8. Les œufs sont montés sur lame-lamelles avec 20 μ l de Moviol. Les lames ont séchés à l'abri de la lumière à température pièce pendant 16h.

1.4. Adaptation du protocole pour le haut débit

Le protocole a été adapté pour le haut débit de sorte que les vers sont traités par les ARNi en liquide dans une plaque à 96 puits (voir section 2.3, et 3.2 du chapitre 1 de la quatrième partie).

1. Lorsque les vers sont adultes, ils sont javellisés pendant 4 minutes en ajoutant 100 μ l de solution hypochlorique (0,8 M Hypochlorite de sodium ; 1 M NaOH). Après l'observation de la cassure des adultes par le milieu sous le microscope à dissection, la totalité du liquide de chaque puits est transféré sur un filtre AcroprepTM 96 puits (1,2 μ m Supor NTRL, Pall Life Science). Après filtration, les œufs sont lavés 4 fois avec 200 μ l de M9.
2. les œufs sont resuspendus dans 150 μ l de M9 et transférés dans une plaque de 96 puits à fond plat. La plaque est incubée à 18°C pendant 16 heures sous agitation douce pour permettre aux œufs non arrêtés de poursuivre leur développement embryonnaire normalement.
3. Les œufs et larves L1 sont transférés sur les filtres AcroprepTM 96 puits et laissés 4 minutes à 4°C. Ils sont lavés avec 200 μ l de PBS 0,1% Triton X-100.
4. La perméabilisation est faite pendant 15 minutes à température pièce avec 100 μ l de 0,1 mg/ml chitinase dans du PBS 0,1 % Triton X-100. Puis les œufs sont lavés deux fois dans 200 μ l de M9.

5. La fixation est faite à 4°C pendant 1 heure dans du PBS 0,1 % Triton X-100 et 1 % de formaldéhyde. Les œufs sont lavés trois fois dans du PBS 1 % Triton X-100 froid.
6. Les œufs sont perméabilisés 30 minutes dans du PBS 1 % de Triton X-100 et 5 % de sérum à température pièce. Deux lavages sont effectués avec 200 µl de PBS 1 % Triton X-100.
7. L'ARN est éliminé par incubation dans 100 µl PBS 1 % Triton X-100 contenant 200 µg/ml RNase pendant 1 heure à 37°C. Les œufs sont rincés dans 200 µl de PBS 1 % Triton X-100.
8. Les œufs sont marqués à l'abri de la lumière 10 minutes à température pièce dans 100 µl de tampon PBS 1 % Triton X-100 contenant 1 ng/µl d'iodure de propidium et DAPI 1 µg/ml. Les œufs sont lavés trois fois dans du PBS 1 % Triton X-100.
9. Les œufs sont resuspendus dans 100 µl de M9 et transférés dans une plaque de 96 puits pour être analysée au COPAS, en laissant des puits vides entre chaque échantillon différent pour permettre le lavage des œufs résiduels entre chaque échantillon.

2. Résultats

2.1. Optimisation de la fixation des œufs de *C. elegans*

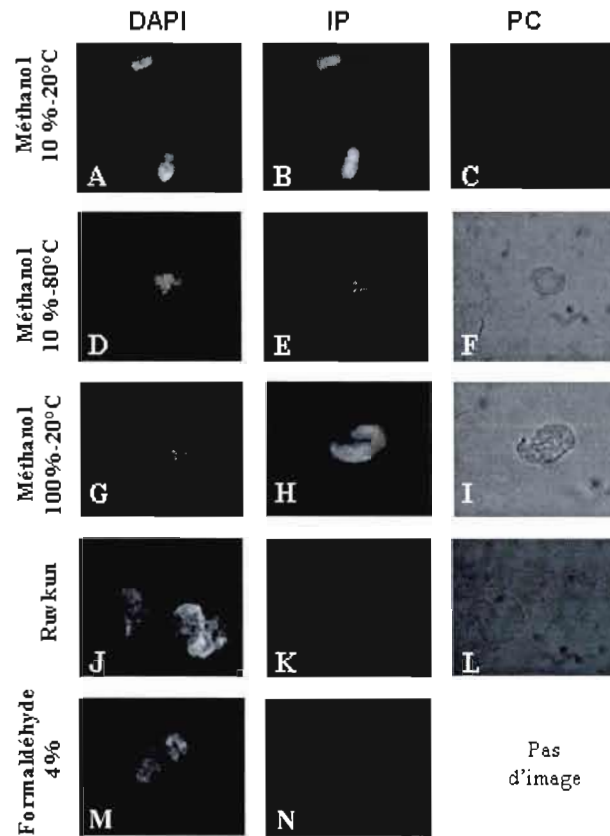


Figure 2.1 Photographies de l'optimisation de la fixation des œufs avec différents fixateurs (méthanol, formaldéhyde et Ruvkun)

Les œufs sont fixés 10 minutes à -20°C dans 10 % ou dans 100 % de méthanol froid ; ou à -80°C dans 10 % de méthanol froid ; ou 10 minutes à -80°C avec du Ruvkun (contenant 2 % de bêtamercaptoéthanol et 4 % de formaldéhyde) ; ou 10 minutes à -80°C avec du formaldéhyde à 4 %. Puis les œufs sont marqués avec 1,5 ng/ μ l d'iodure de propidium et de DAPI 1 μ g/ml.

Nous avons observé 100 % de marquages à l'iodure de propidium lorsque les œufs ont été fixés avec différents fixateurs (méthanol, ruvkun et formaldéhyde). D'une part, l'iodure de propidium était en concentration trop importante (1,5 ng/ μ l) (fixation non spécifique rendant les embryons fluorescents de façon homogène). Dans le protocole de

fixation au méthanol à 100 % (Figure 2.1, photos G, H et I), nous avons diminué cette concentration à 0,2 ng/ μ l mais cette fois-ci la concentration était trop faible et nécessitait une exposition plus longue. Dans les protocoles suivants, la concentration en iodure de propidium a été fixée à 1 ng/ μ l, combinée à une augmentation du nombre de lavages au PBS pour diminuer le marquage non spécifique. D'autre part, l'iodure de propidium pénètre la cuticule mais pas les membranes cellulaires et se fixe non spécifiquement aux surfaces des cellules ou alors se fixe aux ARN contrairement au DAPI qui n'a pas de difficultés à pénétrer les œufs jusqu'aux noyaux des cellules.

Les fixations au Ruvkun (Figure 2.1, photos J, K et L), formaldéhyde (Figure 2.1, photos M et N), méthanol 100 % (Figure 2.1, photos G, H et I) et méthanol 10 % avec congélation à -80°C (Figure 2.1, photos D, E et F) provoquent une altération de la morphologie des œufs. Cela pourrait provenir de la chute de température très rapide et très basse qui ont fait cristalliser l'eau dans les œufs et a fait éclater les coquilles.

Les fixations au méthanol (Figure 2.1, photos A à I) et au formaldéhyde (Figure 2.1, photos M et N) présentaient un désavantage pour récupérer les œufs au moment du montage sur lame et lamelle car les œufs restent collés à la paroi des tubes de plastique. Ceci ne s'est pas produit avec la fixation au Ruvkun (Figure 2.1, photos J, K et L).

L'émission de GFP est peu marquée dans toutes les conditions de fixation. Ceci provient probablement des différentes méthodes de fixation qui dénaturent la GFP qui perd sa capacité à fluorescer. En effet la fluorescence émise par la GFP dans des embryons non marqués était aussi très faible (photos non montrées).

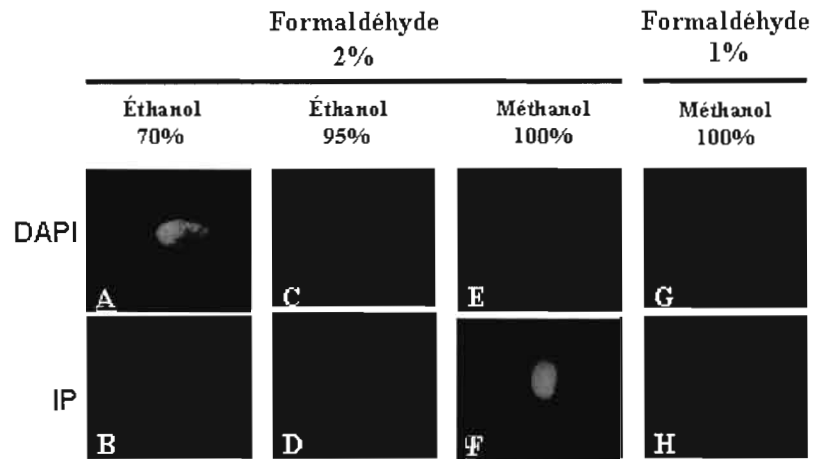


Figure 2.2 Étude de l'effet de la combinaison d'agents fixateurs sur la coloration au DAPI et IP des œufs

Les œufs sont fixés avec 1 ou 2 % de formaldéhyde froid pendant 1 heure à 4°C. Après 3 lavages dans du PBS froid ils sont incubés dans 100 % de méthanol froid ou 70 % ou 95 % d'éthanol pendant 10 minutes à -20°C. Le marquage est fait pendant 10 minutes dans du tampon Tris-HCl Triton composé d'iodure de propidium 1 ng/ μ l et de DAPI 1 μ g/ml.

Le méthanol semble gêner la pénétration de l'IP puisque les noyaux ne sont pas marqués et seule la surface de l'œuf est marquée (Figure 2.2, photos E à H). Il en est de même pour la fixation à l'éthanol (Figure 2.2, photos A à D), surtout celle à 70 % qui empêche également la pénétration du DAPI et par là même le marquage au DAPI.

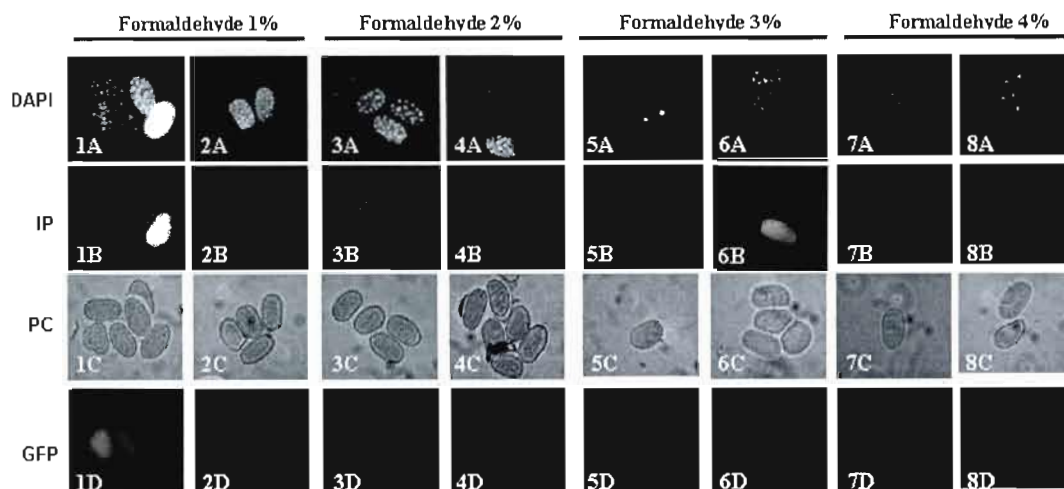


Figure 2.3 Photographies des œufs de *C. elegans* fixés au formaldéhyde. Les œufs sont fixés avec du formaldéhyde froid (1, 2, 3 et 4 %) dans du PBS 1 heure à 4°C. Après trois lavages dans du PBS 1 % Triton X-100, ils sont perméabilisés 30 minutes dans du PBS 1 % Triton X-100 et 5 % de sérum bovin. Ensuite ils sont incubés 30 minutes à 37°C dans du PBS 1 % Triton X-100 200 µg/ml de RNase. Les œufs sont marqués 10 minutes dans 100 µl de tampon PBS 1 % Triton X-100 contenant 1 ng/µl d'iodure de propidium et DAPI 1 µg/ml.

Les œufs sont marqués au niveau des noyaux par le DAPI et par l'iodure de propidium seulement pour les fixations à 1 et 2 % de formaldéhyde (Figure 2.3, photos 1A à 4A). On observe que plus la concentration en formaldéhyde augmente et moins les œufs sont marqués au niveau des noyaux par l'iodure de propidium, ils ont plutôt tendance à être marqués au niveau de l'enveloppe ou des cytoplasmes (Figure 2.3, photos 1B à 8B). De plus les fixations à 1 et 2 % de formaldéhyde n'altèrent pas l'émission de la GFP (Figure 2.3, photos 1D à 4D), comparé aux concentrations plus élevées où l'on n'observe pas d'émission (Figure 2.3, photos 5D à 8D).

Les 5 % de sérum ajoutés dans le tampon permettent une nette amélioration de la fixation des marqueurs d'ADN, en particulier le DAPI (voir Figure 2.3, photos 1A à 4A) si l'on compare au protocole sans sérum avec la même concentration de formaldéhyde (4 %) (voir Figure 2.1, photos M et N). Le sérum bloque probablement les œufs de manière à diminuer la fixation non spécifique du DAPI sur les protéines des œufs.

On peut observer la même amélioration avec le PBS (voir Figure 2.3), qui semble plus approprié que le tampon Tris-HCl (voir Figure 2.1). Ceci est probablement dû au fait que le tampon Tris-HCl est sensible aux changements de température. Le tampon Tris voit son pKa diminuer de 0,03 unités par augmentation de degré Celsius (El-Harakany *et al.*, 1984).

2.2. Optimisation de la perméabilisation

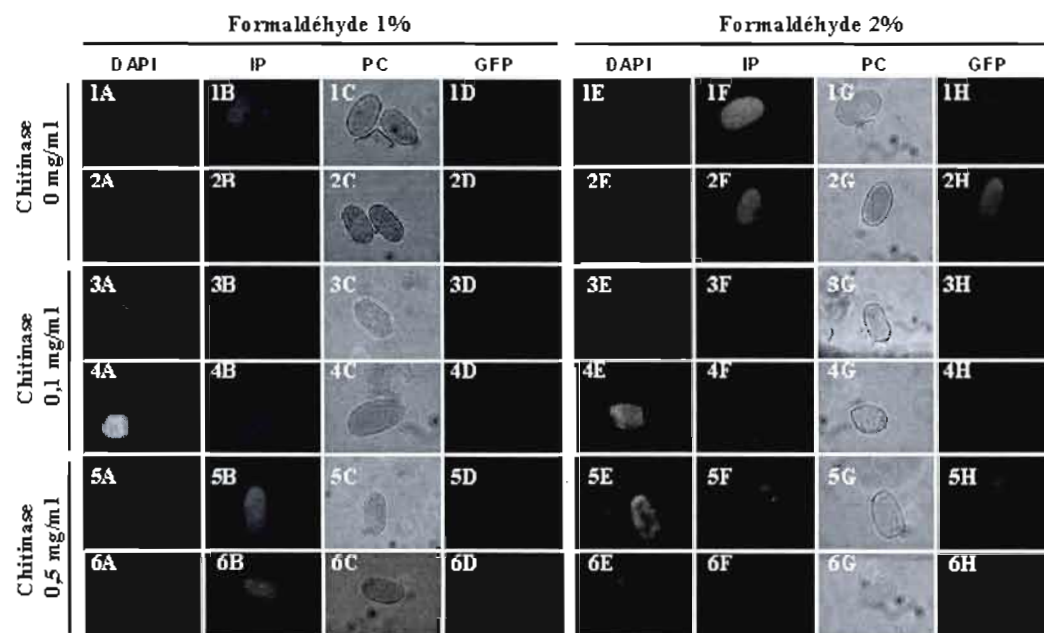


Figure 2.4 Optimisation de la perméabilisation de l'enveloppe des œufs de *C. elegans* avec de la chitinase

Les œufs sont perméabilisés 15 minutes à température pièce avec de la chitinase 0 ; 0,1 et 0,5 mg/ml. Ils sont fixés par 1 ou 2 % de formaldéhyde à 4°C pendant 1 heure. Les œufs sont perméabilisés 30 minutes dans du PBS 1 % Triton X-100 et 5 % de sérum bovin. L'ARN est éliminé dans du PBS 1 % Triton X-100 avec 200 µg/ml RNase pendant 30 minutes à 37°C. Les œufs sont marqués 10 minutes dans du tampon PBS 1 % Triton X-100 contenant 1 ng/µl d'iodure de propidium et 1 µg/ml de DAPI.

Nous avons voulu optimiser la perméabilisation des embryons à la chitinase en raison du faible marquage des œufs au IP (voir Figure 2.3). Ce traitement a pour but d'augmenter la pénétration des colorants d'ADN et d'augmenter le nombre d'embryons marqués.

La chitinase semble abîmer les enveloppes des œufs de sorte que leur morphologie est modifiée (voir Figure 2.4, photos 1C à 6C et 1G à 6G). La fixation au formaldéhyde 1 % sans traitement à la chitinase donne les meilleurs résultats en terme de marquage des noyaux par l'iodure de propidium en présence de traitement à la chitinase (voir Figure 2.4, photos 1B et 2B). Mais il reste du bruit de fond probablement causé par les ARN.

Notre protocole a donné d'assez bons résultats sans chitinase sur des œufs récupérés directement après javellisation des adultes. Par contre lorsque nous avons voulu tester notre protocole sur des œufs incubés 24 heures après la javellisation des adultes afin de permettre à ceux qui n'étaient pas arrêtés de finir leur développement, nous avons constaté que l'iodure de propidium ne pénétrait pas les œufs (photos non montrées). Nous avons donc décidé de les traiter avec 0,1 mg/ml de chitinase avant la fixation, et nous avons obtenus les résultats de la Figure 2.5.

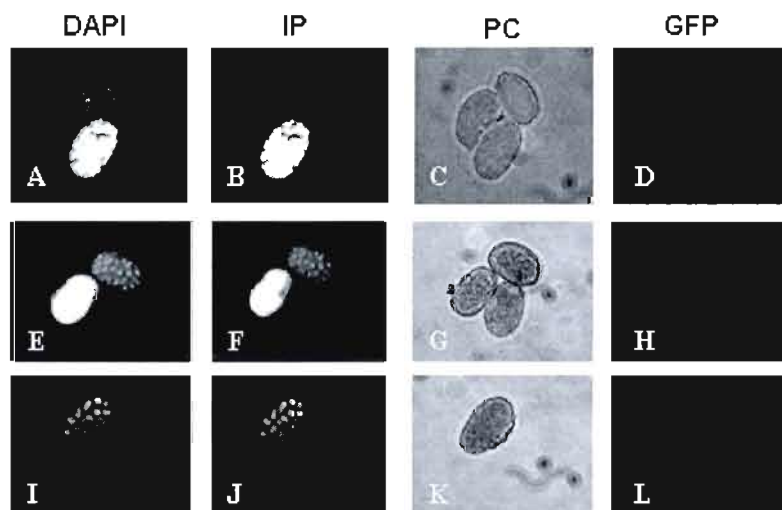


Figure 2.5 Photographies des œufs ayant été javellisés 24 heures auparavant leur marquage à l'iodure de propidium

Les œufs ont incubés 24 heures à 18°C sous agitation après la javellisation des adultes. Puis ils sont perméabilisés avec 0,1 mg/ml de chitinase. Ils sont fixés par 1 % de formaldéhyde. Les membranes cellulaires des œufs sont perméabilisés 30 minutes dans du PBS 1 % Triton X-100 et 5 % de sérum bovin. L'ARN est éliminé par incubation dans du PBS 1 % Triton X-100 avec 200 µg/ml RNase pendant 1 heure à 37°C. Les œufs sont marqués 10 minutes dans du tampon PBS 1 % Triton X-100 contenant 1 ng/µl d'iodure de propidium et 1 µg/ml de DAPI.

Nous pouvons constater que les œufs sont tous marqués au niveau des noyaux aussi bien par le DAPI que par l'iodure de propidium (voir Figure 2.5, photos A, B, E, F, I et J), et les œufs avec peu de cellules sont très bien marqués (voir Figure 2.5, photos A et B). Il ne reste pratiquement plus de bruit de fond, ce qui signifie que l'ARN a été mieux éliminé par l'ARNase pendant 1 heure plutôt que 30 minutes (voir

Figure 2.4, photos 1A, 2A, 1B et 2B). La chitinase n'a pas causé de dommages à la structure de l'œuf (voir Figure 2.5, photos C, G et K) mais a permis la pénétration des marqueurs d'ADN. De plus, le marquage est très similaire entre les deux marqueurs (voir Figure 2.5, photos du DAPI : A, E et I comparées aux photos de l'IP : B, F et J), alors que dans les protocoles précédents l'iodure de propidium marquait toujours les œufs moins intensément que le DAPI (voir par exemple Figure 2.4, photos du DAPI : 1A et 2A comparées aux photos de l'IP : 1B et 2B). Enfin l'émission de GFP n'est pas empêchée par le marquage des œufs (voir Figure 2.5, photos H et L).

3. Discussion

3.1. Optimisation de la concentration en IP

La concentration en iodure de propidium a été testée à trois concentrations : 1,5 ; 1 et 0,2 ng/ μ l. Les meilleurs résultats ont été obtenus avec une concentration de 1 ng/ μ l.

3.2. Mise au point de la fixation des œufs

Les conditions de fixation au méthanol ne sont pas favorables au marquage des noyaux par l'IP. En effet, le méthanol précipite les protéines, donc les protéines de la coquille sont impénétrables par l'IP. Cependant il n'empêche pas la pénétration du DAPI. L'éthanol quant à lui empêchait même la pénétration du DAPI. Le méthanol et l'éthanol ont donc été supprimés pour fixer les œufs. Les congélations se sont avérées dommageables pour la morphologie des œufs puisqu'ils ont éclaté sous la pression des cristaux de glaces formés à l'intérieur des cellules embryonnaires. La fixation au formaldéhyde à 1 %, donne les

meilleurs résultats de marquage, tout en conservant une bonne morphologie des œufs. En effet le formaldéhyde est un « cross-linker » de protéines, il permet de conserver une bonne morphologie des cellules des embryons.

3.3. Optimisation de la fixation de l'IP sur l'ADN

3.3.1. Utilisation de la RNase

Les photographies des différentes fixations essayées (voir Figure 2.1) ont montré un marquage possible des ARN cellulaires par l'IP. Ainsi, une étape de traitement à la RNase (après la fixation) s'est avérée nécessaire pour augmenter la fixation spécifique de l'iodure de propidium à la chromatine et non sur les ARN cellulaires. Nous avons effectivement constaté une diminution du bruit de fond à une concentration de 200 $\mu\text{g/ml}$ RNase pendant 1 heure à 37°C (voir la Figure 2.5).

3.3.2. Optimisation de la perméabilisation

3.3.2.1. Utilisation de la chitinase

La chitinase provoquait une modification de la morphologie des œufs, même à faible concentration (0,1 mg/ml) lorsqu'ils étaient traités après la javellisation des adultes. Mais lorsque les œufs étaient incubés 24 heures dans du M9 après javellisation, le traitement à la Chitinase permet de perméabiliser les œufs sans les abîmer. De plus, nous observons moins de bruit de fond pour un marquage à l'iodure de propidium d'intensité similaire à celle obtenue par le DAPI. Nous en avons déduit que la javellisation fragiliserait la coquille de l'embryon, entraînant une perte de morphologie après traitement à la chitinase. Il semblerait que l'incubation des embryons pendant 24 heures dans du M9 permet d'éviter cette fragilisation excessive de la cuticule due à la purification des œufs.

3.3.2.2. Utilisation de tampons avec détergents

Les lavages ont été améliorés avec la présence de 0,1 % à 1 % de Triton X-100 dans le PBS. De même que le PBS est plus approprié que le tampon Tris-HCl, probablement à cause de la sensibilité du tampon Tris-HCl aux températures (El-Harakany *et al.*, 1984).

3.3.2.3. Utilisation de sérum

Le sérum a permis une amélioration de la fixation spécifique des marqueurs d'ADN. Ceci est probablement dû à une réduction de la fixation non spécifique des sondes fluorescentes à la surface des œufs.

3.4. Adaptation de la méthode au haut débit

Nous avons réussi à adapter notre protocole optimisé pour un haut débit, permettant ainsi de travailler en plaques de 96 puits et en filtre de 96 puits. Cette méthode permettra d'obtenir rapidement de nombreux résultats pour les interactions génétiques entre les Rho GAP et avec les Rho GTPases. Cette méthode a été principalement mise au point dans le but de permettre une analyse à haut débit par cytométrie en flux (sur le COPAS) des œufs engendrés par les vers mutants et sauvages après traitement ARNi contre les Rho GAP du *C. elegans*. Mais ce protocole pourra être également utilisé pour d'autres analyses d'interactions génétiques au niveau du développement embryonnaire de *C. elegans*.

4. Conclusions

Dans cette partie, nous avons cherché à répondre aux besoins d'une grande quantité d'interactions génétiques à tester entre les Rho GAP de *C. elegans*. D'une part, nous avons mis au point une méthode permettant le traitement ARNi de vers transgéniques histone::GFP et l'analyse des œufs résultants de ce traitement en haut débit sur le cytomètre en flux pour vers (le COPAS Biosort). D'autre part, nous avons adapté cette méthode pour permettre

d'utiliser des souches non fluorescentes, en rendant les œufs fluorescents avant leur analyse, afin d'être capable de tester des interactions génétiques (traiter des mutants non fluorescents avec des ARNi).

CONCLUSIONS

Ce projet de maîtrise avait pour but d'identifier le rôle de Rho GAP au cours du développement embryonnaire du *C. elegans*.

La première partie du projet consistait à caractériser la spécificité catalytique des Rho GAP envers les Rho GTPases *in silico* et *in vitro*. Nous avons réussi à adapter un programme de prédiction de structures tridimensionnelles, Combinatorial Extension (CE), pour faire théoriquement corrélérer une similitude structurelle avec la spécificité catalytique des GAP. Nous avons validé cinq interactions de la littérature chez les mammifères et quatre interactions de la littérature chez *C. elegans*. Ceci nous a permis entre autre de justifier l'utilisation de cet animal comme modèle pour étudier les mécanismes de régulation des GTPases Rho chez l'humain, puisque les interactions semblent être bien conservées. Nous avons espéré valider ce projet par les essais expérimentaux sur toutes les Rho GAP de *C. elegans*. Cependant, il a fallu tout d'abord mettre au point les essais. Plusieurs étapes du protocoles ont été changé permettant d'obtenir une GTPase plus active, une réduction de la fixation non spécifique des GTPases sur les GAP. Il reste à régler un problème de spécificité de détection des protéines GAP par la sonde Ni-HRP.

La deuxième partie consistait à étudier les interactions fonctionnelles des Rho GAP au cours du développement embryonnaire du *C. elegans in vivo*. Quatre interactions nous permettent dès à présent de mieux comprendre le réseaux de régulation de la GTPase rho-1 par les GAP *rga-5*, *gei-1* et *rga-13* au cours de l'élongation embryonnaire. Nous avons de plus identifié une interaction antagoniste entre *ocr1-1* et *rga-5*. Cela pourrait être le cas aussi pour *rga-1* mais l'expérience reste à être confirmée.

La troisième partie nous a permis de mettre au point une méthode d'analyse haut débit pour l'étude des interactions génétiques qui pourraient être appliquées aux Rho GAP. Dans un premier temps, nous avons optimisé une méthode permettant le traitement ARNi de vers transgéniques histone::GFP et l'analyse des œufs résultants de ce traitement en haut débit par cytométrie en flux (le COPAS Biosort). Dans un deuxième temps, nous avons

adapté cette méthode pour permettre d'utiliser des souches non fluorescentes, en colorant les noyaux des cellules des embryons fixés.

Il resterait à améliorer la spécificité de détection des GAP par la sonde Ni-HRP lors des essais d'interactions *in vitro* des GAP avec les GTPases, ce qui permettrait de valider notre prédicteur.

Il serait intéressant de tester les ARNi des six GTPases de *C. elegans* sur les mutants de *rga-5*, ce qui nous permettrait d'identifier la spécificité catalytique de *rga-5* *in vivo*.

Il faudrait également continuer à tester les 369 interactions restantes entre les Rho GAP grâce à la nouvelle méthode à haut débit.

Ce travail a apporté de nouveaux outils (le prédicteur) et a permis de simplifier les méthodes de travail pour l'étude des machineries de régulation de GTPases Rho au cours du développement embryonnaire du ver. La technique haut débit pourrait très bien s'adapter à l'étude d'autres régulateurs tels que les effecteurs les GEF, etc.

APPENDICES

APPENDICE A

INTERPRÉTATION DES SCORES DE CE ET DALI

Interprétation des résultats de CE

Rmsd : distance (en Å) entre les carbones en α (C- α)

Z-Score : pourcentage de comparaison attribué à partir du modèle statistique de CE

>4.5 similarité de la même famille

4.0 – 4.5 similarité de la super famille

3.7 - 4.0 certaines similarités peuvent se retrouver

<3.7 similarité peu significative

Gaps : nombre de positions non aligné

CPU : temps (en seconde) pour faire l'alignement

Sequence identities : pourcentage de similarité de positions alignées

Interprétation des résultats de DALI

Z plus grand que 2 : significativité de similarité

Z plus petit que 2 : absence de similarité significative

APPENDICE B

CARTE DES INTERACTIONS GAP-GTPASES GÉNÉRÉES PAR CE MODIFIÉ

Échantillons	Interactions avec les Rho GTPases													
	Cdc42, Rac1, Rac2, RhoG	Cdc42, rac1, rac2	Cdc42, Rac1	RhoA, RhoB, RhoC	Cdc42, rac1, RhoA	Cdc-42, Rac1	Cdc42, Rac1	Cdc42, rac1, rhoA	Cdc42, Rac1	Cdc42, rac1, rhoA	RhoA	RhoA, RhoC, Cdc-42	Cdc42, Rac1, RhoA	Cdc42, RhoA
GEM interacting protein	29,8	36,8	36,6	29	28,8	31,7	28,2	43,4	29,6	27,8	30,3	25	23,9	28,4
Rho GAP 10	31,5	34,6	37,1	30,5	54,9	39,4	28,2	34,4	31,7	30,7	22,1	29,1	30,3	65,3
PRR5-ARHGAP8 fusion	35	27	27,6	29	26,1	26,6	23,3	26,4	27,3	26,7	24	26,4	34	27,9
ARAP1h protein	28	33,3	31,3	30,6	26,8	24,2	31,5	30,1	32,9	33,1	26,9	27,3	30,8	33,3
ENSP00000342566	55	35,6	33,3	41,2	35,3	44,8	26	32	35,6	24,8	30,7	26,7	59,4	27,5
ARHGAP22	42,6	35,1	33,3	32,9	32,8	20	31,9	28,2	34,7	35,1	35,1	23	43,2	28,2
OCRL	29,4	19,1	22	18,8	15,6	16,1	17,8	18,8	16,8	19,4	22,3	19	27,5	17,7
ENSP00000374523	28,7	30,5	35,5	33,9	65	36,9	26,8	34	30,5	27,9	23,2	28,6	31,7	57,2
Rho/Cdc42/Rac GAP RICS	33,3	32,7	35,7	31	29,7	46,2	63,8	29,1	32,2	24,6	26,9	29,6	29,2	28,7
Centaurin-delta 3	24,6	27,9	27,5	30,8	27,5	27,3	30,6	27,6	23,6	31,8	27,4	28,2	21,9	26
KIAA1688	32,5	29,5	26,5	29,1	26,4	3,6	29,2	24,8	26,7	22,9	23,4	28,4	33,6	25,5
Isoform 2 TC10/CDC42 GAP	34	35,9	37,4	32,1	30,3	44,6	61,5	26,7	32,2	25,7	29	28,2	29,2	30,6
Isoform 2 srGAP3	29,1	30,4	36,1	26,2	30,5	31,8	27	26,4	27,8	33,3	27,6	24,5	29	25,5
F02569_2	33,3	38,5	38,2	33,3	34,1	40,9	32,9	30,3	24,1	31,5	24,1	30,3	32,6	35,9
Isoform 2 BCR	35,7	100	40,7	33,5	29,3	67,7	34,6	32,9	37,3	32,2	28,1	25,3	34,2	33,1
Isoform Alpha-chimaerin	32,4	44	72,6	32,5	38,2	43,9	33,5	37	34	38,4	28,8	26,7	27,4	36,5

.../...

Échantillons :	Interactions avec les Rho GTPases													
	3BP1	BCR	CH10/beta ehimerin	MYO9B/Myosin-IXb	OPHN1/oligophrenin 1	clone BRAMY3017920	CdcGAP	ARHGAP29/PARG1	RBP1/RaiA-binding protein 1	Rho GAP 5/p190 Rho GAP	Rho GAP 6	Rho GAP 7/p122 Rho GAP	ARHGAP 17	ARHGAP26
	Cdc42, Rac1, Rac2, RhoG	Cdc42, rac1, rac2	Cdc42, Rac1	RhoA, RhoB, RhoC	Cdc42, rac1, RhoA	Cdc-42, Rac1	Cdc42, Rac1	Cdc42, rac1, rhoA	Cdc42, Rac1	Cdc42, rac1, rhoA	RhoA	RhoA, RhoC, Cdc-42	Cdc42, Rac1, RhoA	Cdc42, RhoA
Isoform 4 PtdIns-3-kinase p85-alpha	22,1	22,5	24,7	23,3	25,6	25,8	22,9	25,9	21	27,1	24,5	18,6	23,8	25,5
ARHGAP21/ARHGAP10	29,9	42,2	39,4	27,5	31,3	37,9	30,4	33,3	27,8	29,2	30,3	25,9	27,6	32,6
BCR	35,7	100	40,7	33,5	29,3	67,7	34,6	32,9	37,3	32,2	28,1	25,3	34,2	33,1
Isoform court BCR	36,5	79,4	39,5	32,5	32,6	83,9	35,5	35	34,5	31,5	29	26,4	32,6	35,1
ARHGAP12	33,8	39,7	36,3	32,7	32,3	43,9	31,5	28,5	30,8	28,7	28,3	28,9	28,3	32,7
FAM7A2	28,4	24,3	24,3	31,9	29,3	29,5	27,3	26,8	23,2	27,1	25	35	27,9	24,1
FAM13B	25,9	28,4	23,4	20,3	28,9	25	24,5	29,1	25,2	26,1	28,2	23,2	24,5	25,4
chimerin 1	32,4	44	72,6	32,5	38,2	43,9	33,5	37	34	38,4	28,8	26,7	27,4	36,5
ARHGAP6/Rho GAP 6 isoform 1	25	28,1	26,7	31	23,7	31,2	29,9	25,2	28,7	24,1	100	27,5	23,1	21,2
ARHGAP26/Rho GAP 26	31,9	33,1	36	28,6	55,7	37,9	26,3	30,3	28,9	25,1	21,2	27	29,4	100
C20orf95	27,3	30,2	24,3	24	23,6	29,2	24,3	25,6	29,9	21,5	33,1	32,2	24,8	24,6
Rho GAP 29/PARG1	25,2	32,9	38,1	29,5	34,2	28,6	25,6	100	27,8	27,7	25,2	28,2	28,7	30,3
ARHGAP5 protein/p190-B	28,8	32,8	38,1	26,9	30,8	36,2	21,9	27	29,7	93,7	25,6	26	27,1	27,1
ARHGAP8/Rho GAP 8	33,3	22,6	25	35,9	25,7	26,6	26,2	20,8	31,6	27,8	31,7	24,1	34,1	24,1
ARHGAP8/Rho GAP 8	35	27	27,6	29	26,1	26,6	23,3	26,4	27,3	26,7	24	26,4	34	27,9
clone BRAMY3014613	100	35,7	34	35,9	29,8	34,9	32,6	25,2	28,4	28,6	25	29,9	62,9	31,9
SH3BP1	100	35,7	34	35,9	29,8	34,9	32,6	25,2	28,4	28,6	25	29,9	62,9	31,9
Integrase-like protein	29,9	39,9	33,9	29,3	30,9	43,9	27,8	28,7	27,9	32	26,3	25	27	35,5
Isoform 2 ARHGAP22/Rho GAP 22	38,7	38,7	33,1	33,6	28,7	37,5	29,8	28,8	29,8	29,6	28,2	24,1	40,1	29,3
Isoform 2 SRGAP1	28	33,6	37,6	24	31,5	34,8	27,9	27,4	26,4	32	25,5	23,1	28,3	24,5
Isoform 4 ARHGAP30/Rho GAP 30	31,9	34	33,9	32,7	32,1	43,1	63,8	30,3	36,4	25,1	25,5	28,9	28,5	30,4
RICS	31,7	32,7	39,3	32,7	29,5	49,2	69,7	28	33,6	26,2	31,8	28,7	27,1	28,4
Isoform 2 ARHGAP24/Rho GAP 24	37,8	39,3	33,1	30,4	30,1	35,9	29	26,3	30,6	30	27,1	23,4	36,8	29,6
SYDE1	33,3	38,5	38,2	33,3	34,8	40,9	32,9	30,3	23,4	31,5	24,1	30,3	32,6	35,9
HMHA1	35,5	44,1	39,3	31,1	35,4	41,3	29,3	50,9	28,9	31,5	31	27,7	31	37
FKSG42	29,1	36,1	30,6	28,2	34	34,4	26	29,7	28	26,5	24,8	21	29	33,9
RACGAP1	31,5	33,6	31,2	31,6	34,1	5,2	28,7	28	30,3	26,7	25,5	23,1	30	33,6
DKFZp434F1016	29,6	30,3	32,3	54	28,3	33,9	36,4	28,8	30,8	26,1	27,2	27,9	29,6	27
ARHGAP12/Rho GAP 12	40,4	35,7	36,2	31	31,7	8,6	26	25,8	27,2	26,2	24,3	29,5	32,3	33,3

.../...

Échantillons :	Interactions avec les Rho GTPases													
	3BP1	BCR	CHIO/beta chimernu	MYO9B/Myosin-IXb	OPHN1/oligophrenin 1	clone BRAMY3017920	CdGAP	ARHGAP29/PARGI	RBP1/RalA-binding protein 1	Rho GAP 5/pi190 Rho GAP	Rho GAP 6	Rho GAP 7/pi122 Rho GAP	ARHGAP 17	ARHGAP26
Isoform 4 ARHGAP28/Rho GAP 28	21,4	30,4	24,7	27,5	17,7	31,2	26,9	20,7	30,8	23,4	25,3	23,2	25,2	23,4
Isoform 2 STARD13	30,1	24,5	23,6	31,7	23,7	26,6	25,4	27,1	24,1	22,2	25,4	81,4	23,9	24,1
RBP1	28,4	37,3	31,9	27,5	28,3	41,3	32,9	27,8	100	26,6	28,7	24,1	30,8	28,9
RacGAP1/MgcRacGAP	31	39,3	33,3	32,4	35,6	44,6	29,6	30,1	31,5	28,9	26,9	22,9	30,3	35,5
Rho GAP 1	37,9	27,7	25,6	32,5	28	25	26,1	26,4	28,7	23,4	25,3	29,9	34	24,6
Rho GAP 9	33,3	37,9	33,8	31	28,4	0	30,8	25,9	28,3	26,7	30,1	28,6	29,8	32,2
Rho GAP 20	26,6	23,1	23,1	26,2	24,8	23,8	25,4	24,6	23,2	19,6	28,2	21,3	28,2	23,4
Rho GAP 23	29,9	40,1	37,1	26,9	30,1	37,9	30,4	32,1	29,2	28,6	30,3	24,5	26,9	29,7
Rho GAP 28	21,4	30,4	24,7	27,5	17,7	31,2	26,9	20,7	30,8	23,4	25,3	23,2	25,2	23,4
Rho GAP FLJ46335	23,6	24,3	25	24,5	19,7	25	27,6	15,9	20,6	23,1	57,5	20,3	18,5	17,9
PtdIns-3-kinase p85-beta	24	32	28	33,1	24,6	15,3	25,2	26,2	17,7	24,8	21,6	17,1	22,1	23
myosin IXA	29,6	30,3	32,3	54	28,3	33,9	36,4	28,8	30,8	26,1	27,2	27,9	29,6	27
Cd GAP	32,6	34,6	33,9	31,5	27,3	43,1	100	25,6	32,9	23,2	29,9	28,9	29,9	26,3
centaurin delta 1 isoform a	21	25,9	24,8	25	22,5	21,2	27,4	23,4	25,9	26,1	26,1	21,6	19,2	22,9
BRC isoform a	36,5	79,4	39,5	32,5	32,6	83,9	35,5	35	34,5	31,5	29	26,4	32,6	35,1
Rho GAP 18	29,9	31,5	26	33,6	27,3	33,8	29	28,6	26,4	27,1	30,8	31,5	27,4	29,3
beta chimernu isoform 1	34	40,7	100	33,9	39,8	43,9	33,9	38,1	31,9	36	26,7	26,7	27,4	36
StARD8	29,5	26,2	23,4	28,1	22,4	28,1	30,4	29,9	23,4	19,6	29,1	77,6	23,4	22,8
Rho GAP 11A	28,4	24,3	24,3	31,2	28,6	29,5	26,6	26,1	23,2	27,9	25	34,3	27,1	23,4
similaire BCR isoform 1	11	91,8	28,9	27	25,3	5,6	18,7	25	16,4	19,5	6,8	7,2	8,1	31,5
Rho GAP RICH2	60	38,4	29,7	36,2	33,1	39,7	25,7	30,8	30,3	26,6	24,8	28,4	71,2	29,4
Alpha chimernu/Rho GAP 2	32,1	43,3	71,7	32,3	37	43,9	33,9	36,2	33,8	38,8	27,9	25,7	27,8	36,3
similaire OPH-1 isoform 2	28,7	30,5	35,5	33,9	65	36,9	26,8	34	30,5	27,9	23,2	28,6	31,7	57,2
Rho GAP 27	29,9	39,9	33,9	29,3	30,9	43,9	27,8	28,7	27,9	32	26,3	25	27	35,5
ARHGAP4/Rho GAP 4	30,8	31,3	32,9	28,1	26,4	28,8	25,7	25,9	28,5	29,6	29,7	28	30,3	24,6
RalA-binding protein 1	28,4	37,3	31,9	27,5	28,3	41,3	32,9	27,8	100	26,6	28,7	24,1	30,8	28,9
FAM13A1	29,6	31,2	31,2	28,3	23,9	29,7	31,7	30,4	30,9	28,4	34	28,6	28,9	27,5
GRLF1	30	33,6	35,6	29,4	29,9	35,4	26,3	26,5	30,8	57,5	22,1	27,1	28,3	27,8
BCR (EC 2.7.11.1)	35,7	100	40,7	33,5	29,3	67,7	34,6	32,9	37,3	32,2	28,1	25,3	24,2	33,1

Interactions avec les Rho GTPases

Rho GAP GOLD STANDARD

.../...

Échantillons :	Rho GAP GOLD STANDARD													
	3BP1	BCR	CHIO/beta ctkimerin	MYO9B/Myosin-IXb	OPHN1/oligoplecterin 1	clone BRAMY3017920	CdGAP	ARHGAP29/PARG1	RBP1/Rala-binding protein 1	Rho GAP 5/p190 Rho GAP	Rho GAP 6	Rho GAP 7/p122 Rho GAP	ARHGAP17	ARHGAP26
Rho GAP 9	31,6	37,7	34,5	31,5	30	40,9	34,3	30	34,1	30,4	31,4	28,3	30,7	33,9
Rho GAP 6 isoform 5	25	28,1	26,7	31	23,7	31,2	29,9	25,2	28,7	24,1	100	27,5	23,1	21,2
similaire Rho GAP 21 isoform 1	29,9	40,1	37,1	26,9	30,1	37,9	30,4	32,1	29,2	28,6	30,3	24,5	26,9	29,7
similaire Rho GAP 21 isoform 3	29,9	40,1	37,1	26,9	30,1	37,9	30,4	32,1	29,2	28,6	30,3	24,5	26,9	29,7
Rho GAP 18	27,3	30,2	24,3	24	23,6	29,2	24,3	25,6	29,9	21,5	33,1	32,2	24,8	24,6
similaire BCR isoform 5	35,5	95,6	37,7	34	29,1	67,7	34	33,1	34,3	31,3	27,2	26,1	32,2	32,9
similaire BCR	37,8	91,7	38,2	32,1	29	3,6	30,8	28,1	32,2	27,6	24,6	26,1	35,5	33,9
SYDE2	34,3	39,9	40,4	35,7	32,9	43,9	34	34,2	28,2	26,4	28,2	28	32,4	34,7

Interactions avec les Rho GTPases

Rho GAP GOLD STANDARD

APPENDICE C

LISTE DES PATRONS DE MODÉLISATION DES STRUCTURES 3D POUR LES GAP
DU GOLD STANDARD

Rho GAP	Patron de modélisation 3D		% d'homologie
	Patrons	Noms	
Rho GAP 6			
BCR	2osa	gap chimerin	35
CdGAP	2osa	gap chimerin	35
GAP CHIO/béta chimerin	1xa6A	beta 2 chimerin	100
ARHGAP26	1xa6A	beta 2 chimerin	33
ARHGAP 17	iow3		34
3BP1	1xa6A	beta 2 chimerin	33
clone BRAMY3017920	2osa	gap chimerin	46
MYO9B/Myosin-IXb	1xa6A	beta 2 chimerin	35
OPHN1/oligophrenin 1	1xa6A	beta 2 chimerin	40
Rho GAP 7/p122 Rho GAP	1tx4	rho gap	32
Rho GAP 5/p190 Rho GAP	2ee5	rhogap5	94
ARHGAP29/PARG1	1xa6A	beta 2 chimerin	33
RBP1/Ra1A-binding protein 1	2osa	gap chimerin	34

APPENDICE D

LISTE DES PATRONS DE MODÉLISATION DES STRUCTURES 3D POUR LES GAP
ÉCHANTILLONS

Rho GAP échantillons	Patron de modélisation 3D		% d'homologie
	Patrons	Noms	
GEM interacting protein	1xa6A	beta 2 chimerin	37
Rho GAP 10	2osa	gap chimerin	41
PRR5-ARHGAP8 fusion	1ow3a	rhoArhogap	53
ARAP1b protein	2ee5a	rho gap 5	34
ENSP00000342566	2ovj	rac gap 1	33
ARHGAP22	2ovj	rac gap 1	41
OCRL	2qv2A	ocr1	100
ENSP00000374523	2osa	gap chimerin	37
Rho/Cdc42/Rac GAP RICS	2osa	gap chimerin	35
Centaurin-delta 3	2ee4a	rhogap5	33
KIAA1688	1ow3a	rhoArhogap	30
Isoform 2 TC10/CDC42 GAP	2osa	gap chimerin	38
Isoform 2 srGAP3	2osa	gap chimerin	38
F02569_2	2osa	gap chimerin	33
Isoform 2 BCR	2osa	gap chimerin	44
Isoform Alpha-chimaerin	2osa	gap chimerin	100
Isoform 4 PtdIns-3-kinase p85-alpha	1pbwa	bcr homology domain	100
ARHGAP21/ARHGAP10	1xa6A	beta 2 chimerin	39
BCR	2osa	gap chimerin	44
Isoform court BCR	2osa	gap chimerin	41
ARHGAP12	1xa6A	beta 2 chimerin	36

.../...

Rho GAP échantillons	Patron de modélisation 3D		% d'homologie
	Patrons	Noms	
FAM7A2	1tx4a	gap rho	33
FAM13B	low3a	rhoArhogap	33
chimerin 1	2osa	gap chimerin	100
ARHGAP6/Rho GAP 6 isoform 1	1tx4a	gap rho	35
ARHGAP26/Rho GAP 26	1xa6A	beta 2 chimerin	38
C20orf95	1xa6A	beta 2 chimerin	28
Rho GAP 29/PARG1	1xa6A	beta 2 chimerin	33
ARHGAP5 protein/p190-B	2ee5a	rho gap 5	100
ARHGAP8/Rho GAP 8	low3a	rhoArhogap	63
ARHGAP8/Rho GAP 8	low3a	rhoArhogap	53
clone BRAMY3014613	1xa6A	beta 2 chimerin	33
SH3BP1	1xa6A	beta 2 chimerin	33
Integrase-like protein	2osa	gap chimerin	38
Isoform 2 ARHGAP22/Rho GAP 22	low3a	rhoArhogap	36
Isoform 2 SRGAP1	1xa6A	beta 2 chimerin	39
soform 4 ARHGAP30/Rho GAP 30	2osa	gap chimerin	35
RICS	1xa6A	beta 2 chimerin	38
Isoform 2 ARHGAP24/Rho GAP 24	1xa6A	beta 2 chimerin	33
SYDE1	2osa	gap chimerin	38
HMHA1	1xa6A	beta 2 chimerin	36
FKSG42	2ovj	rac gap 1	91
RACGAP1	2ovj	rac gap 1	99
DKFZp434F1016	2osaa	gap chimerin	35
ARHGAP12/Rho GAP 12	1xa6A	beta 2 chimerin	36
Isoform 4 ARHGAP28/Rho GAP 28	low3a	rhoArhogap	26
Isoform 2 STARD13	1tx4a	gap rho	31
RBP1	2osa	gap chimerin	34
RacGAP1/MgcRacGAP	2ovja	rac gap 1	100
Rho GAP 1	low3a	rhoArhogap	100
Rho GAP 9	1xa6A	beta 2 chimerin	33
Rho GAP 20	1tx4a	gap rho	35
Rho GAP 23	1xa6A	beta 2 chimerin	37
Rho GAP 28	low3a	rhoArhogap	26
Rho GAP FLJ46335	1xa6A	beta 2 chimerin	28
PtdIns-3-kinase p85-beta	1pbwa	bcr homology domain	30

.../...

Rho GAP échantillons	Patron de modélisation 3D		% d'homologie
	Patrons	Noms	
myosin IXA	2osa	gap chimerin	35
Cd GAP	2osa	gap chimerin	35
centaurin delta 1 isoform a	2ee5a	rho gap 5	26
BRC isoform a	2osa	gap chimerin	41
Rho GAP 18	2ovj	rac gap 1	36
beta chimerin isoform 1	1xa6A	beta 2 chimerin	100
StARD8	1tx4a	gap rho	32
Rho GAP 11A	1tx4a	gap rho	34
similaire BCR isoform 1	1xa6A	beta 2 chimerin	33
Rho GAP RICH2	1tx4a	gap rho	35
Alpha chimerin/Rho GAP 2	2osa	gap chimerin	97
similaire OPH-1 isoform 2	2osa	gap chimerin	37
Rho GAP 27	2osa	gap chimerin	38
ARHGAP4/Rho GAP 4	1xa6A	beta 2 chimerin	35
RalA-binding protein 1	2osa	gap chimerin	34
FAM13A1	1ow3a	rhoArhogap	37
GRLF1	2ee5a	rho gap 5	60
BCR (EC 2.7.11.1)	2osa	gap chimerin	44
Rho GAP 9	2osa	gap chimerin	34
Rho GAP 6 isoform 5	1tx4a	gap rho	35
similaire Rho GAP 21 isoform 1	1xa6A	beta 2 chimerin	37
similaire Rho GAP 21 isoform 3	1xa6A	beta 2 chimerin	37
Rho GAP 18	1xa6A	beta 2 chimerin	28
similaire BCR isoform 5	2osa	gap chimerin	41
similaire BCR	2osa	gap chimerin	41
SYDE2	1xa6A	beta 2 chimerin	37

APPENDICE E

SÉQUENÇAGE

A. Séquences ADN

La **Séquence surlignée en gris** est la séquence reconnue lors du BLAST.
Les **domaines GAP** sont indiqués en caractères gras.

1. GAP *cyk-4*

ATGAAGTCCAGTACATCAAAAAGAGAAGGTGTGCGGCGAAAACCTCGCGTCACATT
 TTCAACATGATTCTAAACTCACAGCGACCGCAATTCGATATTAAGGATATAGGAA
 TGTTTCATTTGATTGATGAGATTGAGCGTCTCCGCAAGCTGTGGAAGATTCCGA
 GGAATCCAAAAGCGGCTGAATGCAGATATGAGAGAGGCCGAAGAAGCACTTG
 CAAAAGCTCGCAAGAAGCTGGCAATGTTTCGATATCGATGTCAAAGACACTCAGA
 AACATTTACGCGCGTTGATGGAAGAAAATAAGGCGTTGAAGCTCGATCTAAACG
 TCTACGAGACTCGTGAAGAGCAGCTGAAAGATGCGATGAAGAACGGTATATTCA
 ATAGTCTCACCAAGGAAGACCGCGATCAGTTCAAGTTTCTTCACGAGCCACTGGT
 CCGGACATACTCGAAACGGGTGCAGCAGAGGCATCCACATTTGATGGAGGACAC
 ACAGGACGATGAGGACGATAGTGAGGTGGATTACGATGAAACTGGAGACAGTTT
 CGAGGAAGTTATTCATTTGCGCAATGGAAGAGAGGTCAGAAGAAGCTCAGCTGC
 TGGAAACGCAGTTGGTGGCAAGCGGAGAAGCGCGTCAGCACATGCGATTACTGC
 TGCTGCCAATTCGAAGAGGAGCAGAAGCCGTGTTATGACAGCTACTATAGATGA
 AGAGCCGAATGAGGGTGGTACACCTCCAAAAGATGCCGTGATGATGGTTCTAC
 ACCTCATCAAGAAATGACAACTACCACCACTACCACCACCACCACTACTATTCAT
 AACTCTCGAGCTCAGAACCAGGACCCGCCACGTGTCTCACTTCACCGCCAGCTCA
 CCCGAGGAGCTTGAGCTGTGGAAGTATTCCATCATGCGATCAAACACCAGGAC
 AAACCACAAATAACATCGGCCTCGGCATGTCGTCCGCCATTCTACCAAAGCA
 CACTTGATATCCGAACCCTGAAACGTGGCACGCCGGCGTGGACTAATGGAACAA
 CTCGTGACATCGCAATGAGACCACACACGTTTATAGAGGCAGGAATCAAAGCGA
 TCGAAAATGCGACAAATGTGCTACAGCCCTGAAGCTCGCCACATCAATGAAAT
 GCAGAGACTGTCACCAGTTGTCCATCGTAGTTGCTGCAACAACTTCATCTCCC
 GTGCATACCACGCCCAAGACGATGATGACGCCGAAATCCGCATTACGTGGAGC
 CAAGCCGGGCGCAGGAGAGTTCCGACTTCAAGATTTTTGCACATCTGCGAAGCC

AATGATCCCGGCAGCAGTTATTCATTGTGTGGTTGCCCTGGAGGCTCGTGGA
 CTCACGCAGGAAGGTATTTACCGCGTTCCTGGGCAGGTTAGAACTGTCAAT
 GTGCTTTTGGACGAGTTGAGATCAAAAACGGTACCCAACGTGGGCCTTAC
 GACGTTGAGGTCATCACAGACACCTTAAAACGGTTCCTAAGAGATCTTAAAG
 ACCCGTTGATCCCAAGAACGTCTCGTCAAGAGCTCATCGTTGCTGCAAACCT
 TACTCTACGGATCCAGATAATGGACGTCTCGCCCTGAATCGAGTGATCTGT
 GAGCTCCCCAAGCGAATCGAGACACCCTCGCCTACCTTTTCATTCACTGGC
 GCAAAGTTATCGCACAATCGAGTCCGCAACAAGATGAACTGCGAAGCGATGG
 CGCGGATGGTGGCTCCGGCGGTGATGGGTCATCCAGTGAAGCAATCGCAGT
 CCAAGCGATAGCTGGCAGAGATGCCACGGATTGCCATCGAGCGATGACTG
 CTCTATTTGAATTTGATGATGTATATTGGCAACGATTCTAGGGACATCTGCAGT
 TTCCATGGCTTCTAATCAAATTGAAACGGCTCGACATCAGGACAATTTTGCTCTC
 TGTGATCGTAGCATCCTTGGACCAGTTACAACATCACCAGCCACTCCCCTGCTTG
 CTCGGTCGGCCAACCGACTCGAGCACGTGGTGCTCATCTGCTGGGGTCGATGTT
 CCACGATTAG

2. GAP *gei-1*

ATGCAAAATGGACACCGATCGATGAAACCACGTGTCCAGTCAATGAATATTCTA
 TCGATACCCCTTGAGCCAGAATTCAAATCTTTACCACAAAATGTTCCAGAAAACA
 TCCAGTGCTTCGCCCGCGAAGTACACCAAACAACAGAGAAAATCTCTGGTGA
 TTGAGCCAGATATTAGTCTCATTTTGGCAGCAGGCCAGAATCAATCAAGCTCCAG
 TGATGATGATACTAAAGTTCAGATCGATTCCAACACTCTTCCACAAAATCGG
 CGGAAATACGCTGGAAGACGAAATATGAAGAAAAGGTTTTATTCTACGAGTAAT
 TAAAAGGAAACGAAGATGAAAATGATGAAAATAGTTTCGAAGCAAATCGGAAC
 AAAATCATTGAGTGTGCGCGATTTGAACGGAGATAACATCGATTTCAACAATCG
 GGATTCGGTGAAAAGTGGACATCTCAAATATTCGCCGAGCTTGAATCTATCCCC
 TCAAGTAGGCGTGGATCTATGGAAGTTACGAGAGCTATGACGAATCCACCTCCA
 GAATTGATGATAAATCTTGCTCCAACATTGGCTCCTCCGTCTCCGATGAAAAGGA
 AGCGATTTCCAGTTTTTCGACGAGCAGGAAGCTGGATTTTCAGCCAATTGCTCCAGT
 TCCTTACCAGAGGAGGCAGCAGGAGGATGTTGTCGGGCCTACGTTTCTTCGTGAC
 CTTCTCACTGCCAGTTGCTCACGATCACCGTGCTCCGAATCGAATTACTCGGATC
 GATTAGCCACTTCGGACACAGCAACAACGCAAAAAGCGTCTCGAGCTTCTTCATT
 CGAATGGCTGGAATAATTCGGGTCACGGGAAATATGAACAATGTTTCATCTGATGA
 AGCTGATCGAGAAGTTGCTTCAATTGAAATGGTCAAACAGACAGAAGTGTTGCA
 GAGGAAAAAACTATCGAGGACCTCGAAGAGAGTGTGAATGAGCTTCAGAGCCT
 GGGCAATGGATCATGGTTTCCACATCCACCGCCACCACCAGCTGAGGCCAGGGA
 TCAGATTTACGAGTCTTTGCCGGCTTCATTTGAAATCGCAAGTCAGAAAATCGA
 AAGAATGCGGTTGGAAGTGTGTATGACAATGCGGCCATCAGCAGCAAACCATCA
 TCTCCGAAACAACGTCATTTTCAACAACAAAACCAATCATTGATAGAAAACCAT
 TTTCTCTCGAGAATCTCCCGATGGTACAGCGGCTCACCGAGTTGAGTGCCGCAAA
 GAAAAATGCTGATTCGAAAAACGAGGTGGCAAAGAGAAGCAACACTTTCTCGTT
 ACAGTTGGCTGAACGAGATGCTGTAGATGCCTGCTCGTGGTTGAGGAAAGCCGG
 ATTCTCGAAGTACGCCGATCAATTTGAAGAAGGAAAACCTGCCAATAGTTGCATC
 AAAAGATCCGACGCTGTTGGAAGCTGATCTGCGTGCATTAATCGTCGAATTGAT

GTATTGAATAGATGTCATACTATGAAAGTTGACAGTGTACCAATGAGACGGCGA
ATTAACAACGAGTTCCCACGGCTGGATCCAATGAAAATCGACGATAATAGTGGA
TATTCATCCGATAGTTGGAGGTACGGTAGTGTAGGCGGTAGTCATCATTCTGAATA
CTTGAGTCGCCCATCTGGAAGTGATCATCATGTTTACGGTGGATCATTAGCTAG
AATGCCGAATAGCACGTCTTCTGCGTGGCATCATCAGATGGCTGATCCAACACGA
GACAGTCGAAAGGTGCTTCGAACTGATTGGTACGACGCACAGAACACACCCGCCA
CGTGGTAGAAATAATGATGTCCTTGAAACAGCTTCCTCAGCCGCTTGTGTCAATG
AACTGAACTCAAATTGCAACGATCTCAAAGTGAACGAATCAAAGATCGCGCTA
GAGCGATTATGAAAAAGATGGATCTAAGATCCACTAATAAACGACCAAAAAGAAA
CACGTGGCAGACCTGCTCCAATGAACATTGGGGATCCAGTGCTAGTGTCTACGA
CACTCCGAAAACTCAATCAGGTACACCATATTGATAGGCCCTCGATTTTACCT
GAACGAGGACGTCAACTGTACCCACATCTCCCTATCAAGCCCCTTCTCGGAGCA
AATCAATTGCTCAAAAATAATCGACGAGGCGGTCTTGTATTATTACCCCGACTAG
TCCGAACTCACTTGACACTTCATTCCGGTATTCTGACACTAATTCCAGTGTGGTCT
CTTCCCACCGGTCAAATGGAGAGAGCCGGAGACGTGAGCTCTCAATGCCTCCAC
CGTCAAGGCATCGTGTTCAGATGAATGGTCCATCGTATCCGGTGATGGATGGAAC
ATTGCGTAGGCGGGAAATTATGCCATTTGATTCTTATCTCTATGCTGGAAATCCT
AAGATGCTTGAAAGATATGACAAGACGTATGAAAGTCCGCGAAATTTGATTCCG
GACCGTATGTACGATGATCTCGATGACCTACCTCTGCCAAAATCTACGAAAACCA
CTAACTCGAATTCAACCTCAAACCTCAAACCTCACTTGATAACAAGAAAACCTGATA
ATATCAGCATGTTCAATGATGGATATTATACGCATGAAATCAAAAACCGCCTTGCC
ACGTCATCACAACATCCTAACAACAGTCAAACCGGAGAACCTAAAAGTGAACAC
CGAGAAAATCGATATAATCTCGAGCTCCGACGAGCCAATCGGCCGAACAGCTCT
CACAAAACGAAGTGACTCGGGCTTAGGCTCAAGCCTGTCTCGTTCTCCAAGCGGT
CCACATACTCAGAGAATCCGTCACTCTCTTCTACCGTACTCAAATGCCACGTCAT
CAAGTGCTTCTGCCTACTCATGTTGCTCTTGGGGCTCTTCGACAAAGTTGCTCGAC
GAACAGCAACCATTTTTCACTGATATGGTTCGAGCTGGCAAGATCAATAGATTCTT
TGAATCTTATTGAAATGACAAGGCTTCGGAAAACAGCTTTTCTAAGATTGAGCTC
AATTTTGGAGCGGAATATTGAAGGGAAGGGGGTTCGGATTGGTGGATCCGGATCA
AGAAGAACTTCCATCGAAACATGTGTGGAGTGTGCAGAGATTGATTAAGAAT
GAAGATCAATGATGGACAAAAACGAGAAAAAGATGTAGATGGAGATGGTGCAG
TTTTTGGTGTGGTCTAGATGTGATCTTCAATCGAACCGGTTACTTCTACCCCG
ACCCATCCTGGAAGTCATGAAATTCCTCCGAAACATTGCGCCGGAAACTGTC
GGAATCTTCCGTAAGAATGGCGTCAAATCCCGAATCGCTGAACTTCGATCGA
TAATTGAAAGCTACAGTGGGAATACGGATGTATTTGTTGGAGAGAATCTTCT
CGACTCGACACAGGTTTCAATGATGTGGCTGATCTTCTGAAAACAGTACTTCCGA
GATCTTCCCAGCCACTGATGACTGTTAAGATGTTCGGAGGTTTTTCGCAATA
TTTTGCTCGGTGGTGCCGGATGTTGAAAGAATAACTGCTCTCCAATACGCAAT
TCTTCTTCTGCCTGACGAAAACCGTGAAGCTCTCAAACTCTTCTTCTTCTC
CTGAAAGAAGTTTCAAGGAACTCCAAGTGAACAATATGACTGCTCAAAACC
TATCAGTATGCTTCACCCCGTCTCTGTTCCAACCTGGAGCATCCCGGCTCGA
CAAGGTAACCCCCGGGAATCGGCGGCACAAAACCTGTCGGAGCAACTGGTCT
ACCGTCTGAAAAAGAGATGAAGGAGGCGAGAGCTTGTCAATTGTGCTTGAC
AATGCTCATTGAGTACGTGCAGACAGTATTCATGGTGCCTGATGGGCTTGATG
ATAGCATGGACGCCGAAGACGACAATCCAACCTAACGGAACCTCGGATTAAGAAG
GACCCCGTTCCTTCTGTTGATCGGGTAATTGATCTGATCAGAGATCACTCGGA

TCAATGGAAGAATTGGACGATTGAAGGATCATTCCGTGGAATTGAAATATCTTCA
 AAACGACCGTCAGATTCTCATCCATTGAAAACGTTCCGTGTATGGTTGAATGTTC
 CCGCCGGGCGGAAGAGTGCATGATGAGGCTGCTCAAAGAGCGATACACATGGG
 ATTCTTCAGTGATTAATTGGAGACATTTGGAGTATGTGAGTGTCCAGACACGGA
 TATTCATCAATACGTTGTCAATGAGACAATTGGACATCCAACGAAGGATTGCCAC
 GTTGAAGATTCCACTCGTCCGGTCTCACAGAAATCCGTGGAGCATGTGCAATTG
 CGGAGCGAAGTGTGAAATGTACGGAAGATCAACTGTTGGGTGGAGTGTCCGGCTA
 CGATATTGACCAACGCTTCCTGATTGAGCCAGTCAGTGGTGGACAGTCACGGGT
 TAACTATAATTGCTCGGGTCGATCTTAAAGGTCGGTCACTTCAATGGTACAACAAA
 TCATTCCGATCCATAATGTGCCGCCACTTGGATCGTCTCCGAGAATCTTCCATCT
 TGGAGACAAAGGCGGCCAGAACTAATGTCTAA

3. GAP *ocr1-1*

ATGAAAATTAACAGTGAATTTGATATTTGTCTTCTTTTCTCAAGCTATCAAGAAA
 AGCAAACGAGCCCGAATCGAGGCGACAAAAAAGGAAAGATTATCAGTAAAAGA
 GAAAATCGGAAGAGAAGCGTCGTCAAAGACGTAAAACGTCTCTTTTCGAAACAAA
 GTGACGATGGCGACGACGACGTTTTACACGAAACAACGATGTAATTGGATAGAA
 GGAAGAGATGCAAAAAGTTGATGAAGTTATGAGAGAATGGATGCATAAATTCTGC
 ACCTTTCAAGATGTCAAAAATTTGTGTTTTCAACATTTAATGTGAATGGAAGAAGCC
 CATTGTCAGTTTTCCCCACATGGTTTTCTCAAAAACCCGAGGATATCGCAGAATT
 TTATGCTGTTGGTCTTCAAGAAATGGATCTTTCCGTTGGAACCTATATAATTGACA
 ATACAAAGAAAATGGAAGGATGGGTTGATGCGATTCACTGTTCTTTACCAGGAG
 GACGAACGCAATTCAATGTGGTAGGATCAATGCGTCTCGTTGGAATATTTGTAAT
 CGTTTTTCAAGCGTTAATAGCAAAGTACGAGTCAGTGATGTGAATGTGAAATAT
 GTTGAACGGGAATATCAGTTCTAGTTAACAATTTGGGTAATAAAGGAGGAACA
 GCAGTTTCAATGAAAATGAATGACACTTGGGTTTGCTTTGTGAATGCTCATTTCG
 CAGCTGGTAACAATGAATTAGAACGGAGAAATCAAGATTTTCGAGATATTTACA
 ATGATATGGTATTTTATCCGAGAAGTCAACAGGAAGGTTTGCGTGATCGTCTCT
 TGAAGTTCCAATAATGTGCCTCTATGATCATGATGTCGTTTTCTGGTTTGGAGACT
 TGAATTATCGATTAAACACTGATATGTATGGAATTTCAAACGACGAAGTTCGACG
 AATAGCTTCAAGTGATAAATTTGCTGATTTGCTCCAACATTGTCAGCTCCGCGAA
 CAAATGGCTCGTGGTACCGTTTTCAAAGATTTCGAAGAACCATCAACGTTACCAT
 TTCGACCAACTTATAAATACGATTGTGGAACGAATACATGGGATACAAGTGAAA
 AAGGAAGAGTTCCTGCATGGACTGATCGAATTTAACATTTAAAAAGTATCCACA
 AGTTGGATTGGAATCAATCCGTCTATGGTGAGTATTGATACAATCACAATATCC
 GATCACAAGCCAGTACGAGCCATGTTCAATTTGAAAGTAAAGAAAATCAATGAA
 AGTGGAGCGAATAATGTATACGAGGAGGCAATACGAGAAGCTGATCGACGAGC
 AAATGAAGAATTACCACAGGTTCAATTAAGTCTAAATGAAGTTGATTTTGGAAAT
 GTCATTTATTTGGAACCTAAAACACGTAGTGTTATTGTGCAGAATGTTGGAAAAT
 CAAAGGTGCGTTCTCATTCAAAGTTCGTCCAAACGCTCGAAATAATCAAGAGAT
 TTGCGAGAAATGGTTAATGGTGACACCTACTCATTACCAGATACCACAAGGATCT
 TCTATGGAGATCAGCTTAACGGTATCAATAAGCACGGATATTGTTTCGACGAATTC
 AAGATTTGATTCGAAATGGGCAGCTCCAAGAAATCTTGTCTTACATTTAGAAAA
 TGGACGTGATTATTTTATTCCAATCACAGCAGTTTATAACAATTCATGCTTTGGA

AGTACATTGGAGAACTTTTATCAATGAGACCAAAAAAGAAGTTAATCTCATC
 GATTTTGGAGATTTCTCGGAAAATTCACITTTCTGACAACTGTCCTCCAAATGTTT
 CTCGAGTAATTTATCGGCTTGTGATGGCTCTTCGAAACACGTGGAGCAGTTCA
 GTTAAATATTGAAGAAGAACAGGACAATGAGGTCTTTAATAGAATCAGATCT
 GCACTTGAATCTGGACAGCCCAGCATTGAGCCAACTTGCATCTTCTTATA
 TGTGTACAGCGCATTAAATACGATTGCTCGACTCTCTGGATGAGCCTATAAT
 TTTGGAAGGAATGTTCAAAATCATTATAAAGAAATGATAAAATATCGAACC
 GATGCCAGACAATTATGGACCGTTGTTTCGATCAAGTCTTCCCAAACAGAATC
 AAGCAGTTCTCGAATTGATATGTCTGATGCTCCGAGAGTTCTTTAGTCAGAA
 ATACGAATTGAAAGATCAATTATCACTTTGGGCAACTGTATTATCCGGCAC
 GATATTCAAGATGAGAAAATGCATGGAATGTTCTCAACTATACTACAACTA
 TATGTGACTATGCTCCTGATGTTGCCTTAGGATAA

4. GAP *rga-1*

CaaATGGACACGAAACATCCTCCGGATCCATCAGGTCCATCAGATCCCAACATAA
 ATCTTGGAGAATTCGAAGATCCGGTGGATGGCTATGCCGATGATGACCTTCTCAC
 ACCGGATGACCTAAGCGTAAGTGTCACTGGAATGACGCCATCTCGATCGTTTCTG
 GAACTGAAGAATTCGAGACAGAGCTTGGAGGTGTTGAACCGTTCGAAGATCTT
 TTCAACGACATATCAGCTCACGAAATTATTCAAGTAATTGCTGATGGGGATCGAG
 TTGGAAGGCCAATTGTTGTCGTATATGCTTATCGGCTCCCATCAAGCAAGGAAAT
 AGATCATGCCAGACTTCTACAGTATTTGGTACAAATTATTGATAAGATCGTTGAC
 CAAGACTACACAATTGCTATTTTCACTATGGCCTACGAAGTCACAACAAACCAC
 CGGTACGGTGGCTGTTCCAGGCTTACAAACAACCTTGATCGTAGATTCAAAAAGA
 ACCTGAAAGCGCTCTACGTAGTGCATCCAACACGATTCATCCGCATTATCTTCTC
 GCTGTTCAAAGTTTCATATCGAGCAAGTTTGAGAACAAGTTCCACTATGTCATG
 TGTATAGACGAGCTGGAGAACGCACTTTCAGTGGCAAGATTAATCTTCCAAGTC
 CAATTCGAGATCATGATAAATCATTTCAACTCAATCAAATCGACCTGAAACACC
 ACCAGCTCAACCTCTGCCAACACAACAGTTTGGAGTTCCTCTCGAGTTCATCCTG
 TCTCACTGTGGTGGAAACATCCCTCCAATCGTTGACCAGCTCATCGAGTATCTGG
 AAGCTCACGCGTTGACAATGGAAGGAGTTTTCAGGAAAAGTGCTAATATTGGAA
 GTATAAAGAGGCTACAGGATAGAATTAATAAAGGCGAAAAAATTGATTTGAAA
 ATGATCCAGAGTACAAGGACAACGAATACGTGGCTTCCCTGCATGCTTCTGTACT
 TTTGAAGACGTTCTTCAGGAGCCTCGGAGAGCCCCTAACGACCAATAGGCTTTAT
 CCGAAACTTGC GGCTCTTTCAGAAGTATCGAAAACCGAGAAAAGCGCCGCCGTG
 AAAGAATTTGTGAAGCTTCTGCCTCGTGAAAACCTACATTCTTCTGAAAACAGTCA
 TCAAATTCCTAACTCGAGTCGCCGAAAACAGCAAAGTGAATCTGATGACTGCAA
 ACAATTTGAGTGTGTTTTCGGTCCAAATTTGACGTGGCCAACGGATCAAGAAGT
 GCCGATTTCTCAATTGAATAACCTCAATAACTTCTGCTATAAATTAATTGTGGATT
 ATGATTCAGTATTTGATCATTGATcattagggtgttcagettttgcattttccccgTTTTctgactttttgcttact
 gtaatttttattgcatccatattaaalaaaattcauuacactgtcatttatactaaaaatattcaactgataccgactaaac

5. GAP *rga-2*

ggatttttttgacccccgaggactttgaaattttgtgaaagagcaaatgaatctaccacataacaATGATAAGTAGCAAC
 TCGTCGTCGACAAGTCTTAATGTGGAGACGGATTATCCAACAAATGGCAAGAAA
 CCACTGAAAGAAGGATCTGTGCAACTGACATCTCTATCCACACTTTTCACACC
 ATCGATATTTCTTTCTGTACCATGAGACCTTGATAATTTTCGAAACAAAAGGGCGC
 CTGTTCTTACAAACTCAAGGAGAAACTCCGATTGGAAAAGGTTTGGATTGCCTCA
 TCGAACACCGCGGACTCATTCCCTTATTGGATGGCCATTTACCAACTATTTGGTGC
 ATTTTCAGAAACACTGAAGAAAAGGACGAGTGGTTTGGAGCTGTTATCATGTTGTGT
 TCAACAATGCCTCCGGCCACTTTTCACAACGATTTCTATGGAAATTAATGTTCCG
 GGAAGGAAGCAGACAATCCGCCGGCGAGTTGACAATGGTAAAAAGTCGGGGGA
 AATCGTTGTGGATACGGCTGGAGATTTGGGTTTACCGCATACTTCATATCAATTG
 ACTTTGTCTTTTGGAGACAACCTCTCACCGACAGCTCCAAGGACCGGAAAACGTGT
 ACGTTGCAATTATGAGTGAAATCGAAAGGCAGGGTACAAGACTATCAGAAAGCC
 AGAAACAGGCTCTTGACACGTGCCGATTGCAAATTGTCGACTGATACTGTCAAC
 GATCAAATCGACGCTCTGGACCTTCTGCCAAGCAACTTGTGAATAGCATTAAAG
AAGAAAGTGCTAACCAGAACGGATTCCCGATCGATATTCGGCAAAGGATTA
AATGGTCCAACCTCCACCACAACCCATCATGACAATTGTTGATCACCTCCGAA
TGGATGGTTTTGATGCTGAGGGAATCTTCAGAAAGTCCCCGAAACAGAGCA
CATTCAAAGAGCTCAAATGTGAGCTAGACAAAGGTGTGGTTCCAGACTTCCA
TAAGTACAACACACATGTCTTGGCGTCAATTCTCAAGGAATATTTGAGAAGT
ATTCCTGGAAAAGATTCTGTTATCCGGAAATTATGAGCTATGGATGAGAGAGA
TCGCTGACGAGCCGAACACTGAGAAAAAAGTCTCATGCTGCAGAGCTCTGC
TATCTCATCTTCCAACATCTCATAGCATCCTGCTAGCCAATGTGTTAAAGCT
TCTGAACAAGATCTCAAATTCTCCAAGCTCCAAAATGAATGCTTCATCCTTA
TCAGTATGCCTTGCTCCGAGCTTTCTAGAGAGCCCAGATCCAATGGAAGGA
GGGAAGAAGATCCCACCGTTGATAGAGTTCTTAATCTCCCACGCAGCTCAAG
TGATGCCCGGCTTCTCCACAGACAATGTATTTGCCATCATGACCTCCCCAATGGT
AGATCACAATGCGAATATGGTGTGCTCACCGGCGCCAAGTTCTTCTATTCTGAT
 GATGGAGGATCTTCACAGAAAACGCCGATTATTGAGGAATTGAATGACGCCGAC
 GACGCAACCTCCCAATCCTCCCTCGCCGAATCTGATCTCCAGACGAGCCACGTG
 GCACGTCTGCCACCTCGAGACGATATCTGAAATATCCGAACCTCCGACGAACG
 ACGAACGACTAGTCTTCTCGTCTTCCGAAGATGAAGATGATGACGATGAAGATG
 AGCTGAGAGTATATCGACCCAAGAGTTCAACATCCACATCGTCATGCTTCGCGAG
 GACTTCTTTCGTGTCGGAGACTCTGAAGACATCGGCAGATGACGGGGATAAGGG
 ATTGAACAAGGAGACGCCGAGGTCGCCGTGCTTGAACCGGATTCATTTCCAGAG
 GACAGAGGCTCAGCATAGAAACAAAGAAGGCAATATAAAACTCGACTTTGAAGC
 TCTCAAATTCCATCGTCCTAGTGTCCGAAAAAGCTCATTGGAAGAAGTGGCGAG
 GAAAAATTCCGCGGAATTTTTCCACCACAGTCGAGAGCCAAGTGATGCAGCAGT
 TACACCGACTCCGCCAAAAAATGGTTCAACAATGAGAAAAGAGTCAAGAGAAG
 AAGCAACACAGACTGCCGACTGTGGTCTACCACATATCTCATCCAATGATGACTC
 GGACTCTAGATTTCCAGCGTTCAAGAGTAGTAGTGTGCTATGTTGACTGAGCCG
 TACAAATCGTCATCCTCCTCTTTCATCCTCCACATCATCCATCCCATCAGACCCCGC
 ACCTCGTCCATATTTTCTGAAAGAAGAATACACGTCTCTAGCCAATAAACCAACT
 GTCCAAGTGGCTCATTCTCCAGGAGCCGAGCCTGAAAACAATTAACGACCCG
 TTGAATGCCCTCCGACAAAACCTCAATTCTTGCTCAAGAAGTCCCACAGGAGCCGG

TGATGACGTCATCAAGGTTGAGAAGTGAGGCGACGAAGAGCTTGACGAATAGTC
 CGATTATGCCGAGAAGTTATGGTGGAAAGTCTAATGCAGAAGGATCGGGAAGAGC
 ACAGTTTTGTTGCAGACGATTTCTACAAAGCGTCGAGTAGAAAACCAAGAACTGC
 AGCGATCGTCGTCACAGCGGGGACTGACGAGCATGAATAATAACAATAATAGTA
 CAAAACAGATTTATGGCGCCCGACCCTCATCTCTAAAAACGCCTCGACGATTCGG
 AGGAGCCGGCGGAGTAGAAGCCTGTGTTGGAATGGATCCATTGGAGATTAATTG
 GAGTGTGACCAACTGAAAACCTTTTTTCAAGACACAAAAGCCCCCTCAATCGAT
 ACAACTTATAATATGAATTAGattttctgaatttttaatecaaattttaagttaaattgtctctatctcctcctcaatcat
 tccagttcttcagtttcaaataaacaactttttttgaaaaaaattattctgtgatcecccaatttttcagtatcaattggtccttaaatllga
 atgaaatatalcgattttaaaaa

6. GAP *rga-13*

aaccgttttaATGGAAACACCAGTGCCGAAACCAAGGACAAAATTTGAGCCATCGTCC
 CCTGAACCAACGTTGCCTCCAAGACCTCCTGTGAAGCCACCTCGTGCCGTTGCAA
 ATCAACAGCTGTTCAAATTTTGGCAATGTATTGGGAGAGTTGCGATTAAACTT
 GAACGAGACGATTTCTTCTCAAGATCCACCGGGAATTGGATTTATCGAAGTGAGT
 CCGGGGACTTCGATGAGCCCACCACAAAGACATGCTCCACCGCCTCCGAGACCA
 CCTCCACCAGCTGGATGGAAACAGCATCCCGTCATTCCCGAACGAATTCAATTA
 ATCGACCTCTTCTTCTCTCCCAATCGACGTTTCATTGACTCCGGTATATTCAGAA
 CCGTCAACATCATCGCCGAGCTCGACTAATTGTTACGAAAATCACAATTCAAGTG
 TGGTGGAGAATCCTCTATACCTCTCGCTAGACACTTATCGATCCATTTCTGGAATT
 ACGCCCTCACCGTCAAATGCTCCCACCACATCGCCAGATTGTGATGAGCTGAGAG
 AATGGCTAACAGAGGAAGAGGAAAATGAATCATGCTCATCGAGTCGTCTGAAA
 ATCTCAACGCCAGCATTCCAGCCCCAATACCAGGGGATGATTCCCGGCCATCTAT
 AGACTCCGAAGAAAACCCATACACTCCATGTCCACGAAGAAGTGATTATGATAA
 TTCTGAGTTTATCGGATCTACCATAGATCCATTTGATGATTTCGTTTTACACGGACA
 ACACAACAATAATTCACATCAAATCTCTATGTTTTCGCCGCAATTCGTGAAAGA
 AAAGACAAAAGCGAATGTGATCGGTATGAAAATGTCGTGCAAAATCTGCTCTTC
 ACCAGATCCACCACCAACTCACTTATATGTCAATGTGCCGCAATCTATCCATCA
 GCTGACAATATTATTTCTTCCAGAATCAGATGATGTTTTTAGAGATGAAGGAAAA
 TGAATAATTGATGGAAGCTCTATTACGTTTGTGCGATTTGTTTTCGTTGACTAGTTCA
 AAAAAAGAAAACGTTTACATTGCCGTCTCCGCAATATGCAGTTGTCTTTTACG
 ATGATGAAGATTCTACAGAACCAAGTAATGGAACATTCGATATTAAGGCATCT
 ACCTGTTTCCGCATATGGCTCCGATACTCCATACATTTTGATTACGTGGGAGA
 AAAACGAAACGTTATCTCGTTTATCCAGAAGATCCTCCGAACCTTTGGATGTTT
 TTCTTTCCGAAGCTTGGCTCTCACTCAACTACGGTCTAACATCAGTTCTTCGTGA
 CGCTGATGAGCTCACAATATGTGGTATCACTTGGATAAAACACGGAACCACCGG
 AGAATGGAAAATATGTTCTGCTGGAATTAATGGTCTAACACTTCACTATATGTTG
 GTGGACGCAAAGGATCGAATCTATAATCGAAATAGTGAGCGGTGAGATGCTGGT
 ACATCGTTTATGTCAACTGTAGGGTCCATTATTGGAGATGAGCTCGTAGAAGTGC
 ATTTACGGAAAGTGATGACGATGCGGGAAAGAATTGATAAATCCGAGTTCTGTC
 CTAATGCAAGACATAAACGAGGACCCTTCTCAATTACGCTTACGGAGTGACACT
 CTACATCGACTCCCGTGACGATTCTACAACCTTCTCACTGGTACGAGGCGATCGAG
 GCTCTTCTCAAAGACCAGCTACTCGTCTAGAGAATCTTCGACTCACTGGGGATA

ATATTCCAGTTATTGTCGACAAGTGTATTCGATTTGTTTCGGCGTATGGAATGAA
ATGCGAAGGAATTTATCGAAGAAATGGAAAAGTCACTGAGGCAAAGACAATATT
AACCAAATTGACAGAAGATCCCGTCGGTTATTACCCAGTTCATGAGAATGATGA
GACAGTATATGCTGTAGCCGATGTCCTTCGGCAATTCTTCAGAAAACCTTGATGCG
CCATTGTTTCCGTCTTCTTCTCAAGCTGATCTTTTTGATCTCGCAACTGAATCACA
ATCCGACGAATTATGTGCTCGATACGCCCAATTGATAAACACATTCGAACTAGTA
CATCGTTCAACGCTCAAAAACTAATCGGACATCTGAAAAACGTATCAGAACAC
GCCCAAGAAAATCGAGCAAGTGTGAGAATCTGGCAAAGGTTTTTTCGGCTTCG
TTGTTTTTACGGATGCAATGGATGAAAAAGTGTTCAGCGAGAGTTATAATCATC
AGATTAATGTGCTAATTCATTTGACCACTGGATATGATGTTGTTTTTTCAGATCAGC
ATTGAGGAAGAGTTGAGTCGGCAGATGGTAAATGATGCCGAGAAGAAATCGTTT
AATGCGAAAAAGCCAAGTCCCGACTTCATCGTGGCGATCCACGTTTGGGAGAAA
GAAAACCGCCCGTTCAATGTGAAAATGAGCTTGGCGAGTGAGGAAGTTTGTAGA
GAGGCTATTGCAAAACGTGGATTTCGACGGACCACCCGATTCTCCATATGCGATAT
TCGAGTGTCTAGCCGGTGGAAACCTAATCAGACGACTTCCGAATGCTCAGAAAA
TGTCAAAATGTGTACTTCAATGGATTGATTGGAATTGTAAGATGCATATCTATT
GTTTGATCATGATAAATATCAATTCAACGGGACTGATATGTCATGTTTTACTGGG
AAAATCAAAATCGCTGAGCCTGGGTACGAACATTCAAATCGTATGAAGTCAAG
ATTGAAAATGGGACTTCGATTGTCGCGTTCGGAAACGAGAAACTCTGGAAAGCG
TGGCCTATGGATGATTTCGATTTGGTATGTTGGCACCGAGCCAACAAGAAAATCGC
CAAACCTGTTCAACGCAACTATGATTTGTTTCGACGAAAACCTGGCTATTCCAGTAG
CCGATTTCTGGCTTCTGCTTCTCGTTTAAAGAAGAAACGGACAGAAATCGCTGG
TTAACAGCACTTTCACATTTTACAAAAGTATCGATTCTGAACCGCTCGTTTATAT
TTGAatttatattcatgatTTTTaatgattgccatctctttgclattaccaatgttctttctgtgalattagatgatttgaattgcattgtt
gaactaaattgttttgaataagaattgttccaaaatTTTTTTTaaatataaatcaatattctgtataaagctactaccfatttactcaca
gtgcaataataacat

B. Résultats du séquençage

1. GAP *cyk-4*

En moyenne, 882 pb ont été séquencées.

```

ID      7214832
NOM     cyk4_P1001429_055.ab1
1       NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN gactcactat agggcgaatt gggtagcggg cccccctcg
61      aggtcgacgg tatcgataag cttgatatca caagtttgta caaaaaagca ggcttgtacg
121     acgatgacga taaggatcga tggggatccg agctcgagat ctgcagcagc atgatgacgc
181     cgaaatccgc attacgtgga gccaaagccgg gcgcaggaga gtcccgactt caagattttt
241     gcacatctgc gaagccaatg atccccggcag cagttattca ttgtgtggtt gccctggagg
301     ctcgtggact caccgaggaa ggtatttacc gcgttcctgg gcaggttaga actgtcaatg
361     tgcttttga  cgagttgaga tcaaaaacgg tacccaacgt gggccttcac gacgttgagg
421     tcatacaga  caccttgaaa cggttcctaa gagatcttaa agacccttg  atcccaagaa
481     cgtctcgtca agagctcatc gtgctgcaaa cctctactct acggatccag ataatggacg
541     tctcgccttg aatcgagtga tctgtgagct cccccaagcg aatcgagaca ccctcgccta
601     ccttttcatt cactggcgca aagttatcgc acaatcgagt cgcaacaaga tgaactgcga
661     agcgatggcg cggatggtgg ctccggcggg gatgggcat  ccagtgaagc aatcgacgtc
721     ccaagcgata gctggcagag atgccacgga ttgccatcga gcgatgactg ctctatttga
781     atttgatgat gtatatggc  aacgattcct atgaggaatt cgaagcttgg ctgttttggc
841     ggaccagct  ttcNNNtaca aagtgtgat atcagatctg ccggtctccc tatagtgagt
901     cgtNNNNNNN NNNNtNaNNN NNNNNNNcNt cctNNctNNN NNNctcNg NNctcgNNNg
961     NtcgNNNgNN NNNNNNNgNN tcagNNcact NaNNNNNNNN NNNNcNNNNN NNNNNNNNNN
1021    NNNNNNNNNN NNNNNNNNaN NNNNNcgNNN NNNNNaaggg c

```

2. GAP *gei-1*

En moyenne, 585 pb ont été séquencées.

```

ID      7158114
NOM     gei1c_P1001358_049.ab1
1       NNNNNNNNNN NNNNNNNNctc actaNNNNgc gaattgggta ccgggcccc cctcgaggtc
61      gacggtatcg ataagcttga tatcacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt gtacgacgat
121     gacgataaag atcgatgggg atccgcggtg tggagtgtgc agagattgat taaaagaatg
181     gagatcaatg atggacaaaa acgagaaaaa gatgtagatg gagatggtgc agtttttggg
241     gttggtctag atgtgatctt caatcgaaac ggttacttcc taccocgacc catcctggaa
301     gtcatgaaat tcctccgaaa cattcgcccg gaaactgtcg gaatcttccg taagaatggc
361     gtcaaatccc gaatcgctga acttcgatcg ataattgaaa gctacagtgg gaatcggat
421     gtatattgtg gagagaatct tctcgactcg acacaggttc atgatgtggc tgatcttctg
481     aaacagtact tccgagatct tcccagacca ctgatgactg ttaagatgtc ggaggttttc
541     gcaaatattt gctcgggtgg tcccgatggt gaaagaataa ctNctctcca atacgcaatt
601     NNtcttctgc ctgaNNNaNa ccgtgaagct NNNNaaaNNN NNtcttctct tctNNNNga
661     aNNNNNNNNN aactcNNNNN NgannNNNNt gaNNNcNcaa aacNNNNNNN NNNNNttcac
721     cccgtctctg ttcNNNNtg gaNNNtcmNN NNNNNNNNag gtaaccNNNN NNNNNNNNgc
781     gggNNNNNNN NNNNcatNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
841     NNNNNNNNNN NNNNNNaNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
901     NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
961     NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
1021    NNNNNNNNNN NNNtNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNaNNcNNN NNNNNNNtNN
1081    NNNNNNNggN NNNNNNNN

```


3. GAP *ocr1-1*

En moyenne, 888 pb ont été séquencées.

```

ID       7158109
NOM      ocr11c_P1001358_050.ab1
1        NNNNNNNNNN NNNNNNctca ctatagggcg aattgggtac cgggcccccc ctcgaggctcg
61       acggtatcga taagcttgat atcacaagtt tgtacaaaaa agcaggcttg tacgacgatg
121      acgataagga tcgatgggga tccgcgattc caatcacagc agtttataac aatctcatgct
181      ttggaagtac attggagaaa cttttatcaa tgagacccaa aaaagaagtt aatctcatcg
241      attttggaga tttctcggaa aattcacttt ctgacaactg tectccaaat gttctctcgag
301      taatttatcg gcttgtgatg gctcttcgaa cacgtggagc agttcagtha aatattgaag
361      aagaacagga caatgaggtc tttaatagaa tcagatctgc acttgaatct ggacagcccc
421      acgatttgag ccaacttgca tcttcttata tgttgtagag cgcattaata cgattgctcg
481      actctctgga tgagcctata attttggag gaatgttcaa aatcattcat aaagaatga
541      taaaatcgcg aaccgatgcc agacaattat ggaccgttgt tcgatcaagt cttcccaaac
601      agaatcaagc agttctcga tggatattgc tgatgctccg agagtctctt agtcagaaat
661      acgaattgaa agatcaatta tcactttggg caactgtatt attccggcac gatattcaag
721      atgagaaaaat gcatggaatg ttctcaacta tactacaaac tatatgtgac tatgctctcg
781      atgttgctt NNNataagga attcgaagct tggctgtttt ggcggacca gcttctctgt
841      acaaagtggg gatatcagat ctgccggctc ccctatagtg agtcgtatta atttcgataa
901      gccagNNNNc Ntctctcgc actgactcgc tgcgctcggc cgttcggctg cggcgNNNNg
961      tatcagctca ctcaaagNNN NtNNNNNNNt NatNNNNNNN at

```

4. GAP *rga-1*

En moyenne, 812 pb ont été séquencées.

```

ID       7158110
NOM      rga1a_P1001358_017.ab1
1        NNNNNNNNcN NNNNNNcNNN NNNNNNgcga attgggtacc gggcccccc ctcgaggctga
61       cggatcgcg aagcttgata tcacaagttt gtacaaaaaa gcaggcttgg acacgaaaca
121      tcctccggat ccatacaggtc catcagatcc caacataaat ctggagaaat tcgaagatcc
181      ggtggatggc tatgccgatg atgacctctc cacaccggat gacctaaagg taagtgtcac
241      tggaaatgac ccactctgat cgtttctgga aactgaagaa ttcgagacag agcttggagg
301      tggtgaaccg ttcgaagatc ttttcaacga cabatcagct cacgaaatta tccaagtaat
361      tgctgatggg gatcgagttg gaaggccaat tgttgctgta tatgcttacc ggtctccatc
421      aagcaaggaa atagatcatg ccagacttct acagtatttg gtacaaatta ttgataagat
481      cggtgaccaa gactacacaa ttgtctattt ccactatggc ctacgaagtc acaacaacc
541      accggtacgg tggctgttcc aggtctacaa acaacttgat cgtagattca aaaagaacct
601      gaaagcgctc tacgtagtgc atccaacacg attcatcgcg attatcttct cgctgttcaa
661      aggtttcata tcgagcaagt ttgagaacaa gttccactat gtcattgtga tagacgagct
721      ggagaacgca ctttcagtgg caagattaaa tcttccaagt ccaattcgag atcatgatNN
781      Ntcattttca actcaatcaa atcgacctga aacaccacca gctcNacctc tgccaacacN
841      NNNNtttNgN MNtNNtctcg agttcatNNN NNNtcactNN NNNNNNaANN NNNNNNNaat
901      cgtNgNNNNN NNcatNNNNN atNNNNNNNN tcaNNNNNNN NNNNtggNaN NNNNNNNNNN
961      NNNaNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN tNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
1021    NNaaNNNNNN NNNNNNaANN NNNNN

```

5. GAP *rga-2*

En moyenne, 743 pb ont été séquencées.

```

ID      7158082
NOM     rga2a_P1001358_034.ab1
      1  NNNNNNNNNN NNNNNNNact cacNNNNNNNg cgaattgggt accgggcccc cctcagaggt
      61  cgacggtatc gataagcttg atatcacaag ttgtacaaa aaagcaggct tgtacgacga
     121  tgacgataag gatcgatggg gatccgcgtc tggaccttct gccaaagcaac ttgtgaatag
     181  cattaagaag aaagtgctaa ccagaacgga ttcccgatcg atattcgga aaggattaaa
     241  tgggtccaact ccaccacaac ccatacatgac aattggtgat cacctccgaa tggatgggtt
     301  tgatgctgag ggaatcttca gaaagtcccc gaaacagagc acattcaaaag agctcaaatg
     361  tgagctagac aaagggtgtg ttccagactt ccataagtac aacacacatg tcttggcgtc
     421  aattctcaag gaatatttga gaagtattcc tggaaagatt ctgttatccg gaaattatga
     481  gctatggatg agagagatcg ctgacgagcc gaacactgag aaaaaagtct catgctgcag
     541  agctctgcta tctcatcttc caacatctca tagcatctcg ctagccaatg tgttaaagct
     601  tctgaacaag atctcaaat ctccaagctc caaaatgaat gcttcatcct tatctgtatg
     661  ccttgctccg agctttctag agagcccaga tccaatggaa ggagggaaga agatcccacc
     721  gttgatagag ttcttaatct cccacgcagc tcNNNtNatg cccggcttct ccaNNNNNaa
     781  tgtaNNNgcc atcatgacct ccccaatggt agattgagNN NNNNNNNNNN NNNNtgtttt
     841  ggNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNcNaNNNNNg NNNNNNNNNN tNNNNNNNNN NNNccNNNNN
     901  NNNNNNNNNN NNNctNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN
     961  NNNNNNNNNN NNNcNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNN

```

6. GAP *rga-13*

En moyenne, 772 pb ont été séquencées.

```

ID      7158083
NOM     rga13a_P1001358_033.ab1
      1  NNNNNNNNNN NNNNNNNctc aNNNNNNggc gaattgggta cggggcccc cctcagaggtc
      61  gacggtatcg ataagcttga tatcacaagt ttgtacaaaa aagcaggctt ggaaacacca
     121  gtgccgaaac caaggcaaaa atttgagcca tcgtcccctg aaccaaggtt gcctccaaga
     181  cctcctgtga agccacctcg tgccgttgca aattcaacag ctgttcaaaa ttttggcaat
     241  gtattgggag agttgctgatt aaacttgaac gagacgattt cttctcaaga tccaccggga
     301  attggattta tcgaagtgag tccggggact tcgatgagcc caccacaaag acatgctcca
     361  ccgcctccga gaccacctcc accagctgga tggaaacagc atcccgtcat tcccgaacga
     421  attcaattaa atcgacctct tccttctctc ccaatcgagc ttteattgac tccggtatat
     481  tcagaaccgt cagcatcctc gccgagctcg actaattgtt acgaaaatca caattcaagt
     541  gtggtggaga atcctctata cctctcgcta gacacttate gatccatttc tggaaatcag
     601  cctcaccgt caaatgctcc caccacatcg ccagattgtg atgagctgag agaatggcta
     661  acagaggaag aggaaaatga atcatgctca tcgagctgct ctgaaaatct caacgccagc
     721  attccagccc caataccagg ggatgatcc cggccatcta tagactccga agNaaccca
     781  tacactccat gtccacgaan NNNNgattat gataattctg agNNNtccg atctaccatN
     841  Nntccatctg atgNNNcNNN NNacacNNac aacacaacaa ataattcaca tcNNNNtctc
     901  tatgtNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNaaNN NNaaaaaNNN NNNNNNNNcg gtNNNNaNNt
     961  NtNgtNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNNNN NNNNNNNctc NNNNNN

```

C. Résultats du BLAST

1. GAP *cyk-4*

GENE ID: 176815 *cyk-4* | CYtoKinesis defect [Caenorhabditis elegans]
 (Over 10 PubMed links)

Score = 1184 bits (641), Expect = 0.0
 Identities = 644/645 (99%), Gaps = 1/645 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 168  ACGATGATGACGCCGAAATCCGCATTACGTGGAGCCAAGCCGGGCGCAGGAGAGTTCCGA 227
          |||
Sbjct 1232  ACGATGATGACGCCGAAATCCGCATTACGTGGAGCCAAGCCGGGCGCAGGAGAGTTCCGA 1291

Query 228  CTTCAAGATTTTTCACATCTGCGAAGCCAATGATCCCGGCAGCAGTTATTCAATTGTGTG 287
          |||
Sbjct 1292  CTTCAAGATTTTTCACATCTGCGAAGCCAATGATCCCGGCAGCAGTTATTCAATTGTGTG 1351

Query 288  GTTGCCCTGGAGGCTCGTGGACTCACGCAGGAAGGTATTTACCGCGTTCCTGGGCAGGTT 347
          |||
Sbjct 1352  GTTGCCCTGGAGGCTCGTGGACTCACGCAGGAAGGTATTTACCGCGTTCCTGGGCAGGTT 1411

Query 348  AGAACTGTCAATGTGCTTTTGGACGAGTTGAGATCAAAAACGGTACCCAACGTGGGCCCTT 407
          |||
Sbjct 1412  AGAACTGTCAATGTGCTTTTGGACGAGTTGAGATCAAAAACGGTACCCAACGTGGGCCCTT 1471

Query 408  CACGACGTTGAGGTCATCACAGACACCTTGAAACGGTTCCTAAGAGATCTTAAAGACCCG 467
          |||
Sbjct 1472  CACGACGTTGAGGTCATCACAGACACCTTGAAACGGTTCCTAAGAGATCTTAAAGACCCG 1531

Query 468  TTGATCCCAAGAACGTCTCGTCAAGAGCTCATCGT-GCTGCAAACCTCTACTCTACGGAT 526
          |||
Sbjct 1532  TTGATCCCAAGAACGTCTCGTCAAGAGCTCATCGTGTGCTGCAAACCTCTACTCTACGGAT 1591

Query 527  CCAGATAATGGACGTCTCGCCCTGAATCGAGTGATCTGTGAGCTCCCCAAGCGAATCGA 586
          |||
Sbjct 1592  CCAGATAATGGACGTCTCGCCCTGAATCGAGTGATCTGTGAGCTCCCCAAGCGAATCGA 1651

Query 587  GACACCCTCGCCTACCTTTTCATTCACTGGCGCAAAGTTATCGCACAATCGAGTCGCAAC 646
          |||
Sbjct 1652  GACACCCTCGCCTACCTTTTCATTCACTGGCGCAAAGTTATCGCACAATCGAGTCGCAAC 1711

Query 647  AAGATGAACTGCGAAGCGATGGCGCGGATGGTGGCTCCGGCGGTGATGGGTCATCCAGTG 706
          |||
Sbjct 1712  AAGATGAACTGCGAAGCGATGGCGCGGATGGTGGCTCCGGCGGTGATGGGTCATCCAGTG 1771

Query 707  AAGCAATCGCAGTCCCAAGCGATAGCTGGCAGAGATGCCACGGATTGCCATCGAGCGATG 766
          |||
Sbjct 1772  AAGCAATCGCAGTCCCAAGCGATAGCTGGCAGAGATGCCACGGATTGCCATCGAGCGATG 1831

Query 767  ACTGCTCTATTTGAATTTGATGATGTATATTGGCAACGATTTCCTA 811
          |||
Sbjct 1832  ACTGCTCTATTTGAATTTGATGATGTATATTGGCAACGATTTCCTA 1876

```

2. GAP *gei-1*

GENE ID: 175436 *gei-1* | GEX Interacting protein [Caenorhabditis elegans]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 861 bits (466), Expect = 0.0
Identities = 475/483 (98%), Gaps = 0/483 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 148  GTGTGGAGTGTGCAGAGATTGATTAAGAAGTGGAGATCAATGATGGACAAAAACGAGAA 207
          |||
Sbjct 1075  GTGTGGAGTGTGCAGAGATTGATTAAGAAGTGAAGATCAATGATGGACAAAAACGAGAA 1134

Query 208  AAAGATGTAGATGGAGATGGTGCAGTTTTTGGTGTGGTCTAGATGTGATCTTCAATCGA 267
          |||
Sbjct 1135  AAAGATGTAGATGGAGATGGTGCAGTTTTTGGTGTGGTCTAGATGTGATCTTCAATCGA 1194

Query 268  ACCGGTACTTCTACCCGACCCATCCTGGAAGTCATGAAATTCCTCCGAAACATTGGC 327
          |||
Sbjct 1195  ACCGGTACTTCTACCCGACCCATCCTGGAAGTCATGAAATTCCTCCGAAACATTGGC 1254

Query 328  CCGGAAACTGTCGGAATCTTCCGTAAGAATGGCGTCAAATCCCGAATCGCTGAACTTCGA 387
          |||
Sbjct 1255  CCGGAAACTGTCGGAATCTTCCGTAAGAATGGCGTCAAATCCCGAATCGCTGAACTTCGA 1314

Query 388  TCGATAATTGAAAGCTACAGTGGGAATACGGATGTATTTGTTGGAGAGAATCTTCTCGAC 447
          |||
Sbjct 1315  TCGATAATTGAAAGCTACAGTGGGAATACGGATGTATTTGTTGGAGAGAATCTTCTCGAC 1374

Query 448  TCGACACAGGTTTCATGATGTGGCTGATCTTCTGAAACAGTACTTCCGAGATCTTCCCGAG 507
          |||
Sbjct 1375  TCGACACAGGTTTCATGATGTGGCTGATCTTCTGAAACAGTACTTCCGAGATCTTCCCGAG 1434

Query 508  CCACTGATGACTGTTAAGATGTCGGAGGTTTTTCGCAAATATTTGCTCGGTGGTCCCGGAT 567
          |||
Sbjct 1435  CCACTGATGACTGTTAAGATGTCGGAGGTTTTTCGCAAATATTTGCTCGGTGGTCCCGGAT 1494

Query 568  GTTGAAGAATAACTNCTCTCCAATACGCAATTNNCTTCTGCCTGanShenacCgTgS 627
          |||
Sbjct 1495  GTTGAAGAATAACTGCTCTCCAATACGCAATTCCTTCTGCCTGACGAAAACCGTGAA 1554

Query 628  GCT 630
          |||
Sbjct 1555  GCT 1557

```

3. GAP *ocr1-1*

GENE ID: 172822 *ocr1-1* | OCRL (Lowe's oculocerebrorenal syndrome protein)
 homolog [*Caenorhabditis elegans*] (10 or fewer PubMed links)

Score = 1190 bits (644), Expect = 0.0
 Identities = 644/644 (100%), Gaps = 0/644 (0%)
 Strand=Plus/Plus

```

Query 147 ATTCCAATCACAGCAGTTTATAACAATTCATGCTTTGGAAGTACATTGGAGAAACTTTTA 206
      |||
Sbjct 234 ATTCCAATCACAGCAGTTTATAACAATTCATGCTTTGGAAGTACATTGGAGAAACTTTTA 293

Query 207 TCAATGAGACCaaaaaaGAAGTTAATCTCATCGATTTTGGAGATTTCTCGGAAAATTCA 266
      |||
Sbjct 294 TCAATGAGACCAAAAAAGAAGTTAATCTCATCGATTTTGGAGATTTCTCGGAAAATTCA 353

Query 267 CTTTCTGACAACCTGTCCTCCAAATGTTCCCTCGAGTAAATTTATCGGCTTGTGATGGCTCTT 326
      |||
Sbjct 354 CTTTCTGACAACCTGTCCTCCAAATGTTCCCTCGAGTAAATTTATCGGCTTGTGATGGCTCTT 413

Query 327 CGAACACGTGGAGCAGTTTCAGTTAAATATTGAAGAAGAACAGGACAATGAGGCTTTAAT 386
      |||
Sbjct 414 CGAACACGTGGAGCAGTTTCAGTTAAATATTGAAGAAGAACAGGACAATGAGGCTTTAAT 473

Query 387 AGAATCAGATCTGCACCTTGAATCTGGACAGCCCGACGATTTGAGCCAACCTGCATCTTCT 446
      |||
Sbjct 474 AGAATCAGATCTGCACCTTGAATCTGGACAGCCCGACGATTTGAGCCAACCTGCATCTTCT 533

Query 447 TATATGTTGTACAGCGCATTAAATACGATTGCTCGACTCTCTGGATGAGCCTATAAATTTG 506
      |||
Sbjct 534 TATATGTTGTACAGCGCATTAAATACGATTGCTCGACTCTCTGGATGAGCCTATAAATTTG 593

Query 507 GAAGGAATGTTCAAAATCATTTCATAAAGAAATGATAAAATATCGAACCGATGCCAGACAA 566
      |||
Sbjct 594 GAAGGAATGTTCAAAATCATTTCATAAAGAAATGATAAAATATCGAACCGATGCCAGACAA 653

Query 567 TTATGGACCGTTGTTTCGATCAAGTCTTCCCAAACAGAATCAAGCAGTTCTCGAATTGATA 626
      |||
Sbjct 654 TTATGGACCGTTGTTTCGATCAAGTCTTCCCAAACAGAATCAAGCAGTTCTCGAATTGATA 713

Query 627 TGTCTGATGCTCCGAGAGTCTTTAGTCAGAAATACGAATTGAAAGATCAATTATCACTT 686
      |||
Sbjct 714 TGTCTGATGCTCCGAGAGTCTTTAGTCAGAAATACGAATTGAAAGATCAATTATCACTT 773

Query 687 TGGGCAACTGTATTATTCGGCACGATATTCAAGATGAGAAAATGCATGGAATGTTCTCA 746
      |||
Sbjct 774 TGGGCAACTGTATTATTCGGCACGATATTCAAGATGAGAAAATGCATGGAATGTTCTCA 833

Query 747 ACTATACTACAACTATATGTGACTATGCTCCTGATGTTGCCTT 790
      |||
Sbjct 834 ACTATACTACAACTATATGTGACTATGCTCCTGATGTTGCCTT 877

```

4. GAP *rga-1*

GENE ID: 174751 *rga-1* | Rho GTPase Activating protein [Caenorhabditis elegans]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 1332 bits (721), Expect = 0.0
Identities = 727/732 (99%), Gaps = 0/732 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 108 TGGACACGAAACATCCTCCGGATCCATCAGGTCCATCAGATCCCAACATAAAATCTTGGAG 167
          |||
Sbjct 5 TGGACACGAAACATCCTCCGGATCCATCAGGTCCATCAGATCCCAACATAAAATCTTGGAG 64

Query 168 AATTCGAAGATCCGGTGGATGGCTATGCCGATGATGACCTTCTCACACCGGATGACCTAA 227
          |||
Sbjct 65 AATTCGAAGATCCGGTGGATGGCTATGCCGATGATGACCTTCTCACACCGGATGACCTAA 124

Query 228 GCGTAAAGTGTCACTGGAATGACGCCATCTCGATCGTTTCTGGAAACTGAAGAATTTCGAGA 287
          |||
Sbjct 125 GCGTAAAGTGTCACTGGAATGACGCCATCTCGATCGTTTCTGGAAACTGAAGAATTTCGAGA 184

Query 288 CAGAGCTTGGAGGTGTTGAACCGTTTCCGAAGATCTTTTCAACGACATATCAGCTCACGAAA 347
          |||
Sbjct 185 CAGAGCTTGGAGGTGTTGAACCGTTTCCGAAGATCTTTTCAACGACATATCAGCTCACGAAA 244

Query 348 TTATTCAAGTAATTGCTGATGGGGATCGAGTTGGAAGGCCAATTGTTGTCGTATATGCTT 407
          |||
Sbjct 245 TTATTCAAGTAATTGCTGATGGGGATCGAGTTGGAAGGCCAATTGTTGTCGTATATGCTT 304

Query 408 ATCGGCTCCCATCAAGCAAGGAAATAGATCATGCCAGACTTCTACAGTATTTGGTACAAA 467
          |||
Sbjct 305 ATCGGCTCCCATCAAGCAAGGAAATAGATCATGCCAGACTTCTACAGTATTTGGTACAAA 364

Query 468 TTATTGATAAGATCGTTGACCAAGACTACACAATTGTCTATTTCCACTATGGCCTACGAA 527
          |||
Sbjct 365 TTATTGATAAGATCGTTGACCAAGACTACACAATTGTCTATTTCCACTATGGCCTACGAA 424

Query 528 GTCACAACAAACCACCGGTACGGTGGCTGTTCCAGGCTTACAACAACCTTGATCGTAGAT 587
          |||
Sbjct 425 GTCACAACAAACCACCGGTACGGTGGCTGTTCCAGGCTTACAACAACCTTGATCGTAGAT 484

Query 588 TCAAAAAGAACCTGAAAGCGCTCTACGTAGTGCATCCAACACGATTTCATCCGCATTATCT 647
          |||
Sbjct 485 TCAAAAAGAACCTGAAAGCGCTCTACGTAGTGCATCCAACACGATTTCATCCGCATTATCT 544

Query 648 TCTCGCTGTTCAAAGGTTTCATATCGAGCAAGTTTGAGAACAAGTTCCACTATGTCATGT 707
          |||
Sbjct 545 TCTCGCTGTTCAAAGGTTTCATATCGAGCAAGTTTGAGAACAAGTTCCACTATGTCATGT 604

Query 708 GTATAGACGAGCTGGAGAACGCACCTTTCAGTGGCAAGATTAATCTTCCAAGTCCAATTC 767
          |||
Sbjct 605 GTATAGACGAGCTGGAGAACGCACCTTTCAGTGGCAAGATTAATCTTCCAAGTCCAATTC 664

Query 768 GAGATCATGATNNTCAATTTTCAACTCAATCAAATCGACCTGAAACACCACCAGCTCNAC 827
          |||
Sbjct 665 GAGATCATGATAAATCAATTTTCAACTCAATCAAATCGACCTGAAACACCACCAGCTCAAC 724

Query 828 CTCTGCCAACAC 839
          |||
Sbjct 725 CTCTGCCAACAC 736

```

5. GAP *rga-2*

GENE ID: 173079 *rga-2* | Rho GTPase Activating protein [Caenorhabditis elegans]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 1184 bits (641), Expect = 0.0
Identities = 655/668 (98%), Gaps = 0/668 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 147  CGTCTGGACCTTCTGCCAAGCAACTTGTGAATAGCATTAAAGAAGAAAGTGCTAACCAGAA 206
          |||
Sbjct 750  CGTCTGGACCTTCTGCCAAGCAACTTGTGAATAGCATTAAAGAAGAAAGTGCTAACCAGAA 809

Query 207  CGGATTCCCGATCGATATTCCGGCAAAGGATTAATGGTCCAACCCACCACAACCCATCA 266
          |||
Sbjct 810  CGGATTCCCGATCGATATTCCGGCAAAGGATTAATGGTCCAACCCACCACAACCCATCA 869

Query 267  TGACAATTGTTGATCACCTCCGAATGGATGGTTTTGATGCTGAGGGAATCTTCAGAAAAGT 326
          |||
Sbjct 870  TGACAATTGTTGATCACCTCCGAATGGATGGTTTTGATGCTGAGGGAATCTTCAGAAAAGT 929

Query 327  CCCCAGAACAGAGCACATTCAAAGAGCTCAAATGTGAGCTAGACAAAAGGTGTGGTTCCAG 386
          |||
Sbjct 930  CCCCAGAACAGAGCACATTCAAAGAGCTCAAATGTGAGCTAGACAAAAGGTGTGGTTCCAG 989

Query 387  ACTTCCATAAGTACAACACACATGTCTTGGCGTCAATTCTCAAGGAATATTTGAGAAGTA 446
          |||
Sbjct 990  ACTTCCATAAGTACAACACACATGTCTTGGCGTCAATTCTCAAGGAATATTTGAGAAGTA 1049

Query 447  TTCCTGGAAAGATTCTGTTATCCGGAAATTATGAGCTATGGATGAGAGAGATCGCTGACG 506
          |||
Sbjct 1050  TTCCTGGAAAGATTCTGTTATCCGGAAATTATGAGCTATGGATGAGAGAGATCGCTGACG 1109

Query 507  AGCCGAACACTGAGAAAAAAGTCTCATGCTGCAGAGCTCTGCTATCTCATCTTCCAACAT 566
          |||
Sbjct 1110  AGCCGAACACTGAGAAAAAAGTCTCATGCTGCAGAGCTCTGCTATCTCATCTTCCAACAT 1169

Query 567  CTCATAGCATCCTGCTAGCCAATGTGTTAAAGCTTCTGAACAAGATCTCAAATCTCCAA 626
          |||
Sbjct 1170  CTCATAGCATCCTGCTAGCCAATGTGTTAAAGCTTCTGAACAAGATCTCAAATCTCCAA 1229

Query 627  GCTCCAAAATGAATGCTTCATCCTTATCTGTATGCCTTGCTCCGAGCTTTCTAGAGAGCC 686
          |||
Sbjct 1230  GCTCCAAAATGAATGCTTCATCCTTATCAAGTATGCCTTGCTCCGAGCTTTCTAGAGAGCC 1289

Query 687  CAGATCCAATGGAAGGAGGGAAGAAGATCCCACCGTTGATAGAGTTCTTAATCTCCCACG 746
          |||
Sbjct 1290  CAGATCCAATGGAAGGAGGGAAGAAGATCCCACCGTTGATAGAGTTCTTAATCTCCCACG 1349

Query 747  CAGCTCNMNTNATGCCCGGCTTCTCC CGGCTTCTCCGTANNGCCATCATGACCTCCCCAA 806
          |||
Sbjct 1350  CAGCTCAAGTGATGCCCGGCTTCTCCACAGACAATGTATTTGCCATCATGACCTCCCCAA 1409

Query 807  TGGTAGAT 814
          |||
Sbjct 1410  TGGTAGAT 1417

```

6. GAP *rga-13*

GENE ID: 175253 F23H11.4 | hypothetical protein [Caenorhabditis elegans]
(10 or fewer PubMed links)

Score = 1363 bits (738), Expect = 0.0
Identities = 768/796 (96%), Gaps = 0/796 (0%)
Strand=Plus/Plus

```

Query 110 TGGAAACACCAGTGCCGAAACCAAGGACAAAATTTGAGCCATCGTCCCCTGAACCAACGT 169
          |||
Sbjct 12  TGGAAACACCAGTGCCGAAACCAAGGACAAAATTTGAGCCATCGTCCCCTGAACCAACGT 71

Query 170 TGCCTCCAAGACCTCCTGTGAAGCCACCTCGTGCCGTTGCAAATTCAACAGCTGTTCAAA 229
          |||
Sbjct 72  TGCCTCCAAGACCTCCTGTGAAGCCACCTCGTGCCGTTGCAAATTCAACAGCTGTTCAAA 131

Query 230 ATTTTGGCAATGTATTGGGAGAGTTGCGATTAAACTTGAACGAGACGATTTCTTCTCAAG 289
          |||
Sbjct 132 ATTTTGGCAATGTATTGGGAGAGTTGCGATTAAACTTGAACGAGACGATTTCTTCTCAAG 191

Query 290 ATCCACCGGGAATTGGATTTATCGAAGTGAGTCCGGGGACTTCGATGAGCCCACCACAAA 349
          |||
Sbjct 192 ATCCACCGGGAATTGGATTTATCGAAGTGAGTCCGGGGACTTCGATGAGCCCACCACAAA 251

Query 350 GACATGCTCCACCGCTCCGAGACCACCTCCACCAGCTGGATGGAAACAGCATCCCCTCA 409
          |||
Sbjct 252 GACATGCTCCACCGCTCCGAGACCACCTCCACCAGCTGGATGGAAACAGCATCCCCTCA 311

Query 410 TTCCCGAACGAATTC AATTAATAATCGACCTCTTCCTTCTCTCCCAATCGACGTTTCATTGA 469
          |||
Sbjct 312 TTCCCGAACGAATTC AATTAATAATCGACCTCTTCCTTCTCTCCCAATCGACGTTTCATTGA 371

Query 470 CTCGGTATATTCAGAACCGTCAGCATCATCGCCGAGCTCGACTAATTGTTACGAAAATC 529
          |||
Sbjct 372 CTCGGTATATTCAGAACCGTCAGCATCATCGCCGAGCTCGACTAATTGTTACGAAAATC 431

Query 530 ACAATTC AAGTGTGGTGGAGAATCCTCTATACCTCTCGCTAGACACTTATCGATCCATTT 589
          |||
Sbjct 432 ACAATTC AAGTGTGGTGGAGAATCCTCTATACCTCTCGCTAGACACTTATCGATCCATTT 491

Query 590 CTGGAATTACGCCCTCACCGTCAAATGCTCCACCACATCGCCAGATTGTGATGAGCTGA 649
          |||
Sbjct 492 CTGGAATTACGCCCTCACCGTCAAATGCTCCACCACATCGCCAGATTGTGATGAGCTGA 551

Query 650 GAGAATGGCTAACAGAGGAAGAGGAAAATGAATCATGCTCATCGAGTCGTCCTGAAAATC 709
          |||
Sbjct 552 GAGAATGGCTAACAGAGGAAGAGGAAAATGAATCATGCTCATCGAGTCGTCCTGAAAATC 611

Query 710 TCAACGCCAGCATTCCAGCCCAATACCAGGGGATGATTCGGCCATCTATAGACTCCG 769
          |||
Sbjct 612 TCAACGCCAGCATTCCAGCCCAATACCAGGGGATGATTCGGCCATCTATAGACTCCG 671

Query 770 AAGNAAACCCATACACTCCATGTCACGanxxxxGATTATGATAATTCTGAGNMNATCG 829
          |||
Sbjct 672 AAGAAAACCCATACACTCCATGTCACGAAAGAGTATTATGATAATTCTGAGTTTATCG 731

Query 830 GATCTACCATNNNTCCATCTGATGanxxxxcccccccccccccccccccccccccccccccccccccccc 889
          |||
Sbjct 732 GATCTACCATAGATCCATTTGATGATTCGTTTTACACGGACAACACAACAAATAAATTCAC 791

Query 890 atxxxxatctctatgt 905
          |||
Sbjct 792 ATCAAAATCTCTATGT 807

```


RÉFÉRENCES

- Adamson P., Paterson H.F. and Hall A. (1992) Intracellular localization of the P21rho proteins. *J Cell Biol.* **119**: 617-627.
- Arnold K., Bordoli L., Kopp J., and Schwede T. (2006) The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics.* **22**(2): 195-201.
- Baldassare J.J., Jarpe M.B., Alferes L., Raben D.M. (1997) Nuclear translocation of RhoA mediates the mitogen-induced activation of phospholipase D involved in nuclear envelope signal transduction. *J Biol Chem.* **272**(8):4911-4.
- Bazzicalupo P., Wolf N., Hirsh D.I. (1980) Chitinase digestion of the shell of *C. elegans* embryos. *Worm Breeder's Gazette* **5**:36.
- Bektic J., Pfeil K., Berger A.P., Ramoner R., Pelzer A., Schafer G., Kofler K., Bartsch G., Klocker H. (2005) Small G-protein RhoE is underexpressed in prostate cancer and induces cell cycle arrest and apoptosis. *Prostate* **64**: 332-340.
- Billuart P., Bienvenu T., Ronce N., des Portes V., Vinet M.C., Zemni R., Carrié A., Beldjord C., Kahn A., Moraine C., Chelly J. (1998) Oligophrenin 1 encodes a rho-GAP protein involved in X-linked mental retardation. *Pathol Biol (Paris)*. **46**(9):678.
- Birnboim, H.C. (1983) A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. *Methods Enzymol.* **100**, 243-255.
- Black D.S., Bliska J.B. (2000) The Rho GAP activity of the *Yersinia pseudotuberculosis* cytotoxin YopE is required for antiphagocytic function and virulence. *Mol Microbiol.* **37**(3):515-27.
- Boettner B., Van Aelst L. (2002) The role of Rho GTPases in disease development. *Gene.* **286**(2):155-74.
- Boulier E. L.** and Jenna S. (2009) Genetic dissection of *Caenorhabditis elegans* embryogenesis using RNA interference and flow-cytometry. *Methods Mol Biol.* **550**:181-94.
- Boureaux A., Vignal E., Faure S., Fort P. (2007) Evolution of the Rho family of ras-like GTPases in eukaryotes. *Mol Biol Evol* **24**: 203-216.
- Bourne H.R., Sanders D.A., McCormick F. (1991) The GTPase superfamily: conserved structure and molecular mechanism. *Nature* **349**: 117-127.
- Bowerman B., Draper B. W., Mello C. C. and Priess J. R. (1993). The maternal gene *skn-1* encodes a protein that is distributed unequally in early *C. elegans* embryos. *Cell* **74**, 443-452.
- Bowerman B., Eaton B. A. and Priess J. R. (1992). *skn-1*, a maternally expressed gene required to specify the fate of ventral blastomeres in the early *C. elegans* embryo. *Cell* **68**, 1061-1075.
- Boyd L., Guo S., Levitan D., Stinchcomb D. T. and Kemphues K. J. (1996). PAR-2 is asymmetrically distributed and promotes association of P granules and PAR-1 with the cortex in *C. elegans* embryos. *Development* **122**, 3075-3084.
- Braun P., Hu Y., Shen B., Halleck A., Koundinya M., Harlow E., and LaBaer J. (2002) Proteome-scale purification of human proteins from bacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**: 2654 -2659.
- Brenner S. (1974) The genetics of *Caenorhabditis elegans*. *Genetics.* **77**(1):71-94.
- Bustelo XR, Sauzeau V, Berenjano IM.(2007) GTP-binding proteins of the Rho/Rac family: regulation, effectors and functions in vivo. *Bioessays.* **29**(4):356-70.

- Caron E., Hall A. (1998) Identification of two distinct mechanisms of phagocytosis controlled by different Rho GTPases. *Science* **282**: 1717-1721.
- Caruso ME, Jenna S, Beaulne S, Lee EH, Bergeron A, Chauve C, Roby P, Rual JF, Hill DE, Vidal M, Bossé R, Chevet E. (2005) Biochemical clustering of monomeric GTPases of the Ras superfamily. *Mol Cell Proteomics*. **4**(7):936-44.
- Chardin P., Boquet P., Madaule P., Popoff M.R., Rubin E.J., Gill D.M. (1989) The mammalian G protein rhoC is ADP-ribosylated by Clostridium botulinum exoenzyme C3 and affects actin microfilaments in Vero cells. *EMBO J*. **8**(4):1087-92.
- Chen W, Blanc J, Lim L. (1994) Characterization of a promiscuous GTPase-activating protein that has a Bcr-related domain from Caenorhabditis elegans. *J Biol Chem*. **269**(2):820-3.
- Chen W. and Lim M. (1994) The Caenorhabditis elegans small GTP-binding protein RhoA is enriched in the nerve ring and sensory neurons during larval development. *J Biol Chem*. **269**(51):32394-404.
- Chen X.-Q., Tan I., Leung T, Iim L. (1999) The myotonic dystrophy kinase-related Cdc42-binding kinase is involved in the regulation of neurite outgrowth in PC12 cells. *J. Biol. Chem*. **274**,19901-19905.
- Chen Z., Sun J., Pradines A., Favre G., Adnane J., Sebti S.M. (2000) Both farnesylated and geranylgeranylated RhoB inhibit malignant transformation and suppress human tumor growth in nude mice. *J Biol Chem* **275**: 17974-17978.
- Cherfils J., Chardin P. (1999) GEFs: structural basis for their activation of small GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci*. **24**(8): 306-11.
- Cherry L.K., Li X., Schwab P., Lim B., Klickstein L.B. (2004) RhoH is required to maintain the integrin LFA-1 in a nonadhesive state on lymphocytes. *Nat Immunol* **5**: 961-7.
- Chiang S. H., Baumann C. A., Kanzaki M., Thurmond D. C., Watson R. T., Neudauer C. L., Macara I. G., Pessin J. E. and Saltiel A. R. (2001) Insulin-stimulated GLUT4 translocation requires the CAP-dependent activation of TC10. *Nature* **410**: 944-948.
- Chisholm A. D. and Hardin J. (2005). Epidermal morphogenesis (J. Priess and G. Seydoux, Ed. Eds.), pp. 1-22.
- Clark E.A., Golub T.R., Lander E.S., Hynes R.O. (2000) Genomic analysis of metastasis reveals an essential role for RhoC. *Nature* **406**: 532-535.
- Costa M., Draper B.W., et Priess J.R. (1997) The role of actin filaments in patterning the *Caenorhabditis elegans* cuticle. *Dev. Biol*. **184**(2): 373-384.
- Costa M., Raich W., Agbunag C., Leung B., Hardin J., and Priess J.R. (1998). A putative catenin-cadherin system mediates morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* embryo. *J. Cell Biol*. **141**(1): 297-308.
- Côté J.F., Vuori K. (2002) Identification of an evolutionarily conserved superfamily of DOCK180-related proteins with guanine nucleotide exchange activity. *J Cell Sci*. **115**: 4901-13.
- Databases and tools for 3-D protein structure comparison and alignment, <http://cl.sdsc.edu/>
- deBakker C.D., Haney L.B., Kinchen J.M., Grimsley C., Lu M., Klingele D., Hsu P.K., Chou B.K., Cheng L.C., Blangy A., Sondek J., Hengartner M.O., Wu Y.C., Ravichandran K.S. (2004) Phagocytosis of apoptotic cells is regulated by a UNC-

- 73/TRIO-MIG-2/RhoG signaling module and armadillo repeats of CED-12/ELMO. *Curr Biol.* **14**(24):2208-16.
- Delawary M, Nakazawa T, Tezuka T, Sawa M, Iino Y, Takenawa T, Yamamoto T. (2007) Molecular characterization of a novel RhoGAP, RRC-1 of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Biochem Biophys Res Commun.* **357**(2):377-82.
- Derry J.M., Kerns J.A., Weinberg K.I., Ochs H.D., Volpini V., Estivill X., Walker A.P. and Francke U. (1995) WASP gene mutations in Wiskott-Aldrich syndrome and X-linked thrombocytopenia. *Hum. Mol. Genet.* **4**: 1127-1135.
- Diekmann D., Brill S., Garrett M.D., Totty N., Hsuan J., Monfries C., Hall C., Lim L., Hall A. (1991) Bcr encodes a GTPase-activating protein for p21rac. *Nature* **351**: 400-402.
- Diogon M., Wissler F., Quintin S., Nagamatsu Y., Sookhareea S., Landmann F., Hutter H., Vitale N., Labouesse M. (2007) The Rho GAP RGA-2 and LET-502/ROCK achieve a balance of actomyosin-dependent forces in *C. elegans* epidermis to control morphogenesis. *Development.* **134**(13):2469-79.
- Dubois T., Chavrier P. (2005) [ARHGAP10, a novel RhoGAP at the cross-road between ARF1 and Cdc42 pathways, regulates Arp2/3 complex and actin dynamics on Golgi membranes] *Med Sci (Paris)*. **21**(8-9):692-4.
- Dupuy D., Li Q.R., Deplancke B., Boxem M., Hao T., Lamesch P., Sequerra R., Bosak S., Doucette-Stamm L., Hope I.A., Hill D.E., Walhout A.J., Vidal M. (2004) A first version of the *Caenorhabditis elegans* Promoterome. *Genome Res.* **14**(10B):2169-75.
- Ehler E., van Leeuwen F., Collard J.G., Salinas P.C. (1997) Expression of Tiam-1 in the developing brain suggests a role for the Tiam-1-Rac signaling pathway in cell migration and neurite outgrowth. *Mol Cell Neurosci.* **9**(1):1-12.
- El-Harakany A.A., Abdel Halim F.M. and Barakat A.O. (1984) Dissociation constants and related thermodynamic quantities of the protonated acid form of tris-(hydroxymethyl)-aminomethane in mixtures of 2-methoxyethanol and water at different temperatures. *J Elect Chem* **162**(1-2): 285-305.
- Engers R., Springer E., Michiels F., Collard J.G., Gabbert H.E. (2001) Rac affects invasion of human renal cell carcinomas by up-regulating tissue inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 and TIMP-2 expression. *J Biol Chem* **276**: 41889-41897.
- Esteve P., Embade N., Perona R., Jimenez B., del P.L., Leon J., Arends M., Miki T., Lacal J.C. (1998) Rho-regulated signals induce apoptosis in vitro and in vivo by a p53-independent, but Bcl2 dependent pathway. *Oncogene* **17**: 1855-1869.
- Etemad-Moghadam B., Guo S. and Kempfues K. J. (1995). Asymmetrically distributed PAR-3 protein contributes to cell polarity and spindle alignment in early *C. elegans* embryos. *Cell* **83**, 743-752.
- Etienne-Manneville S., Hall A. (2001) Integrin-mediated activation of Cdc42 controls cell polarity in migrating astrocytes through PKCzeta. *Cell* **106**: 489-498.
- Eva A., Aaronson S.A. (1985) Isolation of a new human oncogene from a diffuse B-cell lymphoma. *Nature* **316**:273-275.
- Faucherre A., Desbois P., Satre V., Lunardi J., Dorseuil O., Gacon G. (2003) Lowe syndrome protein OCRL1 interacts with Rac GTPase in the trans-Golgi network. *Hum Mol Genet.* **12**(19):2449-56.

- Fernandez-Zapico M.E., Gonzalez-Paz N.C., Weiss E., Savoy D.N., Molina J.R., Fonseca R., Smyrk T.C., Chari S.T., Urrutia R., Billadeau D.D. (2005) Ectopic expression of VAV1 reveals an unexpected role in pancreatic cancer tumorigenesis. *Cancer Cell* **7**(1):39-49.
- Fidyk N.J. and Cerione R.A. (2002) Understanding the Catalytic Mechanism of GTPase-Activating Proteins: Demonstration of the Importance of Switch Domain Stabilization in the Stimulation of GTP Hydrolysis. *Biochemistry* **41**: 15644-15653.
- Freeman J.L., Abo A., Lambeth J.D. (1996) Rac "insert region" is a novel effector region that is implicated in the activation of NADPH oxidase, but not PAK65. *J Biol Chem* **271**: 19794-19801.
- Fritz G., Just I., Kaina B. (1999) Rho GTPases are over-expressed in human tumors. *Int. J. Cancer* **81**: 682-687.
- Gally C., Wissler F., Zahreddine H., Quintin S., Landmann F., Labouesse M. (2009) Myosin II regulation during *C. elegans* embryonic elongation: LET-502/ROCK, MRCK-1 and PAK-1, three kinases with different roles. *Development*. **136**(18): 3109-19.
- Gao J., Estrada L., Cho S., Ellis R.E., and Gorski J.L. (2001) The *Caenorhabditis elegans* homolog of FGD1, the human Cdc42 GEF gene responsible for faciogenital dysplasia, is critical for excretory cell morphogenesis. *Hum. Mol. Genet.* **10**: 3049-3062.
- Gasman S., Kalaidzidis Y., Zerial M. (2003) RhoD regulates endosome dynamics through Diaphanous-related Formin and Src tyrosine kinase. *Nat Cell Biol* **5**: 195-204.
- Gedeon A.K., Nelson J., Gécz J., Mulley J.C. (2003) X-linked mild non-syndromic mental retardation with neuropsychiatric problems and the missense mutation A365E in PAK3. *Am J Med Genet A*. **120A**(4):509-17.
- Goldstein B. (1992). Induction of gut in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Nature* **357**, 255-257.
- Goldstein B., Hird SN. (1996) Specification of the anteroposterior axis in *Caenorhabditis elegans*. *Development*. **122**(5):1467-74.
- Gonczy P. and Rose L. S. (2005). Asymmetric cell division and axis formation in the embryo (J. Priess and G. Seydoux, Ed. Eds.), pp. 1-20.
- Gotta M., Abraham M.C., and Ahringer J. (2001) CDC-42 controls early cell polarity and spindle orientation in *C. elegans*. *Curr. Biol.* **11**: 482-488.
- Grise F., Bidaud A., Moreau V. (2009) Rho GTPases in hepatocellular carcinoma. *Biochim Biophys Acta*. **1795**(2):137-51.
- Guasch R.M., Scambler P., Jones G.E., Ridley A.J. (1998) RhoE regulates actin cytoskeleton organization and cell migration. *Mol Cell Biol* **18**: 4761-4771.
- Guda C., Scheeff E.D., Bourne P.E., Shindyalov I.N. (2001) A new algorithm for the alignment of multiple protein structures using Monte Carlo optimization. *Pac Symp Biocomput.* pp 275-286.
- Guex N. and Peitsch M. C. (1997) SWISS-MODEL and the Swiss-PdbViewer: an environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* **18**(15): 2714-2723.
- Guo S. and Kemphues K. J. (1995) *par-1*, a gene required for establishing polarity in *C. elegans* embryos, encodes a putative Ser/Thr kinase that is asymmetrically distributed. *Cell* **81**, 611-620.

- Hakem A., Sanchez-Sweatman O., You-Ten A., Duncan G., Wakeham A., Khokha R., Mak T.W. (2005) RhoC is dispensable for embryogenesis and tumor initiation but essential for metastasis. *Genes Dev* **19**: 1974-1979.
- Hart M.J., Eva A., Evans T., Aaronson S.A., Cerione R.A. (1991) Catalysis of guanine nucleotide exchange on the CDC42Hs protein by the dbl oncogene product. *Nature* **354**:311-314.
- Hart M.J., Eva A., Zangrilli D., Aaronson S.A., Evans T., Cerione R.A., Zheng Y. (1994) Cellular transformation and guanine nucleotide exchange activity are catalyzed by a common domain on the dbl oncogene product. *J. Biol. Chem.* **269**:62-65.
- Hart M.J., Sharma S., elMasry N., Qiu R.-G., McCabe P., Polakis P. and Bollag G. (1996) Identification of a Novel Guanine Nucleotide Exchange Factor for the Rho GTPase. *J Biol Chem.* **271**(41): 25452-25458.
- Hedgecock E. M., Culotti J. G., Hall D. H., and Stern B. D. (1987). Genetics of cell and axon migrations in *Caenorhabditis elegans*. *Development* **100**, 365-382.
- Hill C.S., Wynne J., Treisman R. (1995) The Rho family GTPases RhoA, Rac1, and CDC42Hs regulate transcriptional activation by SRF. *Cell.* **81**(7):1159-70.
- Hirano K., Matsuura F., Tsukamoto K., Zhang Z., Matsuyama A., Takaishi K., Komuro R., Suehiro T., Yamashita S., Takai Y., Matsuzawa Y. (2000) Decreased expression of a member of the Rho GTPase family, Cdc42Hs, in cells from Tangier disease - the small G protein may play a role in cholesterol efflux. *FEBS Lett.* **484**(3):275-9.
- Hoffman G.R., Nassar N., Cerione R.A. (2000) Structure of the Rho family GTP-binding protein Cdc42 in complex with the multifunctional regulator RhoGDI. *Cell.* **100**(3):345-56.
- Holm L., Ouzounis C., Sander C., Tuparev G., Vriend G. (1992) A database of protein structure families with common folding motifs. *Protein Sci.* **1**(12):1691-8.
- Holm L., Park J. (2000) DaliLite workbench for protein structure comparison. *Bioinformatics* **16**(6): 566-567.
- Hung T. J. and Kempfues K. J. (1999). PAR-6 is a conserved PDZ domain containing protein that colocalizes with PAR-3 in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Development* **126**, 127-135.
- Hussain N. K., Jenna S., Glogauer M., Quinn C. C., Wasiak S., Guipponi M., Antonarakis S. E., Kay B. K., Stossel T. P., Lamarche-Vane N. and McPherson P. S. (2001) Endocytic protein intersectin-1 regulates actin assembly via Cdc42 and N-WASP. *Nat. Cell Biol.* **3**, 927-932
- Ihara K., Muraguchi S., Kato M., Shimizu T., Shirakawa M., Kuroda S., Kaibuchi K., and Hakoshima T. (1998) Crystal Structure of Human RhoA in a Dominantly Active Form Complexed with a GTP Analogue. *J Biol Chem.* **273**(16): 9656-9666.
- Jalink K., van Corven E.J., Hengeveld T., Morii N., Narumiya S., Moolenaar W.H. (1994) Inhibition of lysophosphatidate- and thrombin-induced neurite retraction and neuronal cell rounding by ADP ribosylation of the small GTP-binding protein Rho. *J Cell Biol.* **126**(3):801-10.
- Jantsch-Plunger V., Gonczy P., Romano A., Schnabel H., Hamill D., Schnabel R., Hyman A.A., and Glotzer M. (2000). CYK-4: a Rho family gtpase activating protein (GAP) required for central spindle formation and cytokinesis. *J. Cell Biol.* **149**: 1391-1404.

- Jenna S. and Chevet E. (2007). High-throughput RNAi in *Caenorhabditis elegans* - from molecular phenotypes to pathway analysis., Ed.^ Eds.), pp. 65-78. Taylor & Francis Group.
- Jenna S. and Lamarche-Vane N. (2004). "The Superfamily of Rho GTPase-Activating proteins." Rho GTPases. Molecular Biology Intelligence Unit, Landes Bioscience. ed. Symons M. pp 68-85.
- Jenna S., Caruso M.E., Emadali A., Nguyễn D.T., Dominguez M., Li S., Roy R., Reboul J., Vidal M., Tzimas G.N., Bossé R., Chevet E. (2005) Regulation of Membrane Trafficking by a Novel Cdc42-related Protein in *Caenorhabditis elegans* Epithelial Cells. *Mol Biol Cell*. **16**(4):1629-39.
- Jenna S., Hussain N.K., Danek E.I., Triki I., Wasiaik S., McPherson P.S., Lamarche-Vane N. (2002) The activity of the GTPase-activating protein CdGAP is regulated by the endocytic protein intersectin. *J Biol Chem*. **277**(8):6366-73.
- Joneson T., Bar-Sagi D. (1999) Suppression of Ras-induced apoptosis by the Rac GTPase. *Mol Cell Biol* **19**: 5892-5901.
- Just I., Wilm M., Selzer J., Rex G., Von Eichel-Streiber C., Mann M., Aktories K. (1995) The enterotoxin from *Clostridium difficile* (ToxA) monoglucosylates the Rho proteins. *J Biol Chem*. **270**(23):13932-6.
- Kamai T., Yamanishi T., Shirataki H., Takagi K., Asami H., Ito Y., Yoshida K. (2004) Overexpression of RhoA, Rac1, and Cdc42 GTPases is associated with progression in testicular cancer. *Clin Cancer Res* **10**: 4799-4805.
- Kamath R.S., Fraser A.G., Dong Y., Poulin G., Durbin R., Göttä M., Kanapin A., Le Bot N., Moreno S., Sohrmann M., Welchman D.P., Zipperlen P., Ahringer J. (2003) Systematic functional analysis of the *Caenorhabditis elegans* genome using RNAi. *Nature* **421**(6920):231-7.
- Kamath R. S., Martinez-Campos M., Zipperlen P., Fraser A. G. and Ahringer J. (2001). Effectiveness of specific RNA-mediated interference through ingested double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Genome Biol* **2**.
- Kay A.J., et Hunter C.P. (2001) CDC-42 regulates PAR protein localization and function to control cellular and embryonic polarity in *C. elegans*. *Curr. Biol*. **11**: 474-481.
- Keep N.H., Barnes M., Barsukov I., Badii R., Lian L.Y., Segal A.W., Moody P.C., Roberts G.C. (1997) A modulator of rho family G proteins, rhoGDI, binds these G proteins via an immunoglobulin-like domain and a flexible N-terminal arm. *Structure*. **5**(5):623-33.
- Khosravi-Far R., Solski P.A., Clark G.J., Kinch M.S., Der C.J. (1995) Activation of Rac1, RhoA, and mitogen-activated protein kinases is required for Ras transformation. *Mol Cell Biol* **15**: 6443-6453.
- Kim J.K., Gabel H.W., Kamath R.S., Tewari M., Pasquinelli A., Rual J.F., Kennedy S., Dybbs M., Bertin N., Kaplan J.M., Vidal M., Ruvkun G. (2005) Functional genomic analysis of RNA interference in *C. elegans*. *Science*. **308**(5725):1164-7.
- Kitamura T., Kawashima T., Minoshima Y., Tonzuka Y., Hirose K., Nosaka T. (2001) Role of MgcRacGAP/Cyk4 as a regulator of the small GTPase Rho family in cytokinesis and cell differentiation. *Cell Struct Funct*. **26**(6):645-51.
- Krugmann S., Stephens L., Hawkins P.T. (2006) Purification of ARAP3 and characterization of GAP activities. *Methods Enzymol*. **406**:91-103.

- Krugmann S., Williams R., Stephens L., Hawkins P.T. (2004) ARAP3 is a PI3K- and rap-regulated GAP for RhoA. *Curr Biol.* **14**(15):1380-4.
- Kunda P., Paglini G., Quiroga S., Kosik K., Caceres A. (2001) Evidence for the involvement of Tiam1 in axon formation. *J Neurosci.* **21**(7):2361-72.
- Kutsche K., Yntema H., Brandt A., Jantke I., Nothwang H.G., Orth U., Boavida M.G., David D., Chelly J., Fryns J.P., Moraine C., Ropers H.H., Hamel B.C., van Bokhoven H., Gal A. (2000) Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nat Genet.* **26**(2):247-50.
- Lamaze C., Chuang T.H., Terlecky L.J., Bokoch G.M., Schmid S.L. (1996) Regulation of receptor-mediated endocytosis by Rho and Rac. *Nature.* **382**(6587):177-9.
- Leahey A.M., Charnas L.R., Nussbaum R.L. (1993) Nonsense mutations in the OCRL-1 gene in patients with the oculocerebrorenal syndrome of Lowe. *Hum Mol Genet.* **2**(4):461-3.
- Lee T.K., Poon R.T., Yuen A.P., Man K., Yang Z.F., Guan X.Y., Fan S.T. (2006) Rac activation is associated with hepatocellular carcinoma metastasis by up-regulation of vascular endothelial growth factor expression. *Clin Cancer Res* **12**: 5082-5089.
- Lehner B., Crombie C., Tischler J., Fortunato A. and Fraser A. G. (2006a). Systematic mapping of genetic interactions in *Caenorhabditis elegans* identifies common modifiers of diverse signaling pathways. *Nat Genet* **38**, 896-903.
- Lehner B., Tischler J. and Fraser A. G. (2006b). RNAi screens in *Caenorhabditis elegans* in a 96-well liquid format and their application to the systematic identification of genetic interactions. *Nature protocols* **1**, 1617-1620.
- Lelias J.M., Adra C.N., Wulf G.M., Guillemot J.C., Khagad M., Caput D., Lim B. (1993) cDNA cloning of a human mRNA preferentially expressed in hematopoietic cells and with homology to a GDP-dissociation inhibitor for the rho GTP-binding proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**: 1479-1483.
- Letunic I., Copley R.R., Pils B., Pinkert S., Schultz J., Bork P. (2006) SMART 5: domains in the context of genomes and networks. *Nucleic Acids Res* **34**(Database issue): D257-60.
- Leung B., Hermann G.J., and Priess J.R. (1999). Organogenesis of the *Caenorhabditis elegans* intestine. *Dev. Biol.* **216**, 114-134.
- Lin R., Thompson S. and Priess J. R. (1995). *pop-1* encodes an HMG box protein required for the specification of a mesoderm precursor in early *C. elegans* embryos. *Cell* **83**, 599-609.
- Lundquist E.A. (2006) Small GTPases. *WormBook* pp 1-18.
- Lundquist E.A., Reddien P.W., Hartweg E., Horvitz H.R., and Bargmann C.I. (2001) Three *C. elegans* Rac proteins and several alternative Rac regulators control axon guidance, cell migration and apoptotic cell phagocytosis. *Development* **128**: 4475-4488.
- Lynch E.D., Lee M.K., Morrow J.E., Welsh P.L., Leon P.E. and King M.C. (1997) Nonsyndromic deafness DFNA1 associated with mutation of a human homolog of the *Drosophila* gene diaphanous. *Science* **278**: 1315-1318.
- Maeda I., Kohara Y., Yamamoto M. and Sugimoto A. (2001). Large-scale analysis of gene function in *Caenorhabditis elegans* by high-throughput RNAi. *Curr Biol* **11**, 171-176.

- Maheshwar M.M., Cheadle J.P., Jones A.C., Myring J., Fryer A.E., Harris P.C., Sampson J.R. (1997) The GAP-related domain of tuberin, the product of the TSC2 gene, is a target for missense mutations in tuberous sclerosis. *Hum Mol Genet.* **6**(11):1991-6.
- Masuda M., Minami M., Shime H., Matsuzawa T., Horiguchi Y. (2002) In vivo modifications of small GTPase Rac and Cdc42 by Bordetella dermonecrotic toxin. *Infect Immun.* **70**(2):998-1001.
- Michaely P.A., Mineo C., Ying Y.S., Anderson R.G. (1999) Polarized distribution of endogenous Rac1 and RhoA at the cell surface. *J Biol Chem.* **274**(30):21430-6.
- Minden A., Lin A., Claret F.X., Abo A., Karin M. (1995) Selective activation of the JNK signaling cascade and c-Jun transcriptional activity by the small GTPases Rac and Cdc42Hs. *Cell* **81**: 1147-1157.
- Mira J.P., Benard V., Groffen J., Sanders L.C., Knaus U.G. (2000) Endogenous, hyperactive Rac3 controls proliferation of breast cancer cells by a p21-activated kinase-dependent pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 185-189.
- Moon S.Y., Zheng Y. (2003) Rho GTPase-activating proteins in cell regulation. *Trends Cell Biol.* **13**(1):13-22.
- Moores S. L. , Schaber M. D., Mosser S. D., Rands E., O'Hara M. B., Garsky V. M., Marshall M. S., Pompliano D. L., and Gibbs J. B. (1991) Sequence Dependence of Protein Isoprenylation. *J Biol Chem.* **266**(22): 14603-14610.
- Morita K., Hirono K., Han M. (2005) The *Caenorhabditis elegans* ect-2 RhoGEF gene regulates cytokinesis and migration of epidermal P cells. *EMBO Rep.* **6**(12):1163-8.
- Moskwa P., Palet M.H., Dagher M.C., Ligeti E. (2005) Autoinhibition of p50 Rho GTPase-activating protein (GAP) is released by prenylated small GTPases. *J Biol Chem.* **280**(8):6716-20.
- Muller H. A. and Bossinger O. (2003). Molecular networks controlling epithelial cell polarity in development. *Mech Dev* **120**, 1231-1256.
- Munro E., Nance J., Priess J.R. (2004) Cortical flows powered by asymmetrical contraction transport PAR proteins to establish and maintain anterior-posterior polarity in the early *C. elegans* embryo. *Dev Cell.* **7**(3):413-24.
- Myagmar B.E., Umikawa M., Asato T., Taira K., Oshiro M., Hino A., Takei K., Uezato H., Kariya K. (2005) PARG1, a protein-tyrosine phosphatase-associated Rho GAP, as a putative Rap2 effector. *Biochem Biophys Res Commun.* **329**(3):1046-52.
- Nakayama A.Y., Harms M.B., Luo L. (2000) Small GTPases Rac and Rho in the maintenance of dendritic spines and branches in hippocampal pyramidal neurons. *J Neurosci.* **20**(14):5329-38.
- Nance J. and Priess J.R. (2002) Cell polarity and gastrulation in *C. elegans*. *Development.* **129**(2):387-97.
- Naud N., Touré A., Liu J., Pineau C., Morin L., Dorseuil O., Escalier D., Chardin P., Gacon G. (2003) Rho family GTPase Rnd2 interacts and co-localizes with MgcRacGAP in male germ cells. *Biochem J.* **372**(Pt 1):105-12.
- Nelson F.K., Albert P.S. and Riddle D.L. (1983) Fine structure of the *Caenorhabditis elegans* secretory-excretory system. *J. Ultrastruct. Res.*, **82**, 156-171.
- Neukomm L. J., Frei A. P., Cabello J., Ma X., Haney L. B., Jovanovic M. Wollscheid B., Ravichandran K. S., Moreno S., Hengartner M. O. (2009) The RhoGAP SRGP-1

- regulates cell killing and clearance through CED-10 in *C. elegans*. International Worm Meeting.
- Nobes C.D., Hall A. (1995) Rho, rac, and cdc42 GTPases regulate the assembly of multimolecular focal complexes associated with actin stress fibers, lamellipodia, and filopodia. *Cell* **81**: 53-62.
- Nobes C.D., Lauritzen I., Mattei M.G., Paris S., Hall A., Chardin P. (1998) A new member of the Rho family, Rnd1, promotes disassembly of actin filament structures and loss of cell adhesion. *J Cell Biol.* **141**(1):187-97.
- Nomanbhoy T.K., Erickson J.W., and Cerione R.A. (1999) Kinetics of Cdc42 Membrane Extraction by Rho-GDI Monitored by Real-Time Fluorescence Resonance Energy Transfer. *Biochemistry*, **38** (6): 1744–1750.
- Ohara Y., Sassa Y., Itakura S., Motoshige K., Tanaka S., Gosho M., Arai H., Inoue T., Kume K., Kobuna H., Miyahara K., Hirata, D. (2009) Role of Rho GTPase signaling in olfactory adaptation. International Worm Meeting.
- Ohga N, Kikuchi A, Ueda T, Yamamoto J, Takai Y (1989) Rabbit intestine contains a protein that inhibits the dissociation of GDP from and the subsequent binding of GTP to rhoB p20, a ras p21-like GTP-binding protein. *Biochem Biophys Res Commun* **163**: 1523-1533.
- Olson M.F., Ashworth A., Hall A. (1995) An essential role for Rho, Rac, and Cdc42 GTPases in cell cycle progression through G1. *Science*. **269**(5228):1270-2.
- Ortiz A.R. Straus C.E., Olmea O., (2002) MAMMOTH (matching molecular models obtained from theory): an automated method for model comparison. *Protein Sci.* **11**(11): 2606-21.
- Pasteris N.G., Cadle A., Logie L.J., Porteous M.E., Schwartz C.E., Stevenson R.E., Glover T.W., Wilroy R.S., Gorski J.L. (1994) Isolation and characterization of the faciogenital dysplasia (Aarskog-Scott syndrome) gene: a putative Rho/Rac guanine nucleotide exchange factor. *Cell*. **79**(4):669-78.
- Piekny A.J., and Mains P.E. (2002) Rho-binding kinase (LET-502) and myosin phosphatase (MEL-11) regulate cytokinesis in the early *Caenorhabditis elegans* embryo. *J Cell Sci.* **115**(11):2271-82.
- Piekny A.J., Johnson J.L., Cham G.D., and Mains P.E. (2003). The *Caenorhabditis elegans* nonmuscle myosin genes *nmy-1* and *nmy-2* function as redundant components of the *let-502*/p-binding kinase and *mel-11*/myosin phosphatase pathway during embryonic morphogenesis. *Development* **130**(23): 5695–5704.
- Piekny A.J., Wissmann A., and Mains P.E. (2000). Embryonic morphogenesis in *Caenorhabditis elegans* integrates the activity of LET-502 Rho-binding kinase, MEL-11 myosin phosphatase, DAF-2 insulin receptor and FEM-2 PP2c phosphatase. *Genetics* **156**(4): 1671–1689.
- Portereiko M.F., and Mango S.E. (2001). Early morphogenesis of the *Caenorhabditis elegans* pharynx. *Dev. Biol.* **233**, 482–494.
- Prendergast G.C., Khosravi-Far R., Solski P.A., Kurzawa H., Lebowitz P.F., Der C.J. (1995) Critical role of Rho in cell transformation by oncogenic Ras. *Oncogene* **10**: 2289-2296.
- Preudhomme C., Roumier C., Hildebrand M.P., Lery-Prudhomme E., Lantoine D., Lai J.L., Daudignon A., Adenis C., Bauters F., Fenaux P., Kerckaert J.P., Galiegue-Zouitina S. (2000) Nonrandom 4p13 rearrangements of the RhoH/TTF gene, encoding a

- GTP-binding protein, in non-Hodgkin's lymphoma and multiple myeloma. *Oncogene* **19**: 2023-2032.
- Priess J. R. and Hirsh D. I. (1986). *Caenorhabditis elegans* morphogenesis: the role of the cytoskeleton in elongation of the embryo. *Dev. Biol.* **117**,156 -173.
- Qiu R.G., Abo A., McCormick F., Symons M. (1997) Cdc42 regulates anchorage-independent growth and is necessary for Ras transformation. *Mol Cell Biol* **17**: 3449-3458.
- Quinlan M.P. (1999) Rac regulates the stability of the adherens junction and its components, thus affecting epithelial cell differentiation and transformation. *Oncogene* **18**: 6434-6442.
- Raich W. B., Agbunag C. and Hardin J. (1999). Rapid epithelial-sheet sealing in the *Caenorhabditis elegans* embryo requires cadherin-dependent filopodial priming. *Curr. Biol.* **9**,1139 -1146.
- Ramakers G.J. (2000) Rho proteins and the cellular mechanisms of mental retardation. *Am J Med Genet.* **94**(5):367-71.
- Reboul J., Vaglio P., Rual J. F., Lamesch P., Martinez M., Armstrong C. M., Li S., Jacotot L., Bertin N., Janky R., Moore T., Hudson J. R., Jr., Hartley J. L., Brasch M. A., Vandenhaute J., Boulton S., Endress G. A., Jenna S., Chevet E., Papsotiropoulos V., Tolia P. P., Ptacek J., Snyder M., Huang R., Chance M. R., Lee H., Doucette-Stamm L., Hill D. E., and Vidal M. (2003) *C. elegans* ORFeome version 1.1: experimental verification of the genome annotation and resource for proteome-scale protein expression. *Nat. Genet.* **34**(1):35-41.
- Reboul J., Vaglio P., Tzellas N., Thierry-Mieg N., Moore T., Jackson C., Shin-i T., Kohara Y., Thierry-Mieg D., Thierry-Mieg J., Lee H., Hitti J., Doucette-Stamm L., Hartley J.L., Temple G.F., Brasch M.A., Vandenhaute J., Lamesch P.E., Hill D.E., Vidal M. (2001) Open-reading-frame sequence tags (OSTs) support the existence of at least 17,300 genes in *C. elegans*. *Nat Genet.* **27**(3):332-6.
- Richnau N., Aspenström P. (2001) Rich, a rho GTPase-activating protein domain-containing protein involved in signaling by Cdc42 and Rac1. *J Biol Chem.* **276**(37):35060-70.
- Ridley A.J., Hall A. (1992) The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors. *Cell* **70**: 389-399
- Riento K., Guasch R.M., Garg R., Jin B., Ridley A.J. (2003) RhoE binds to ROCK I and inhibits downstream signaling. *Mol Cell Biol.* **23**(12):4219-29.
- Ripperger T., von Neuhoff N., Kamphues K., Emura M., Lehmann U., Tauscher M., Schraders M., Groenen P., Skawran B., Rudolph C., Callet-Bauchu E., van Krieken J.H., Schlegelberger B., Steinemann D. (2007) Promoter methylation of PARG1, a novel candidate tumor suppressor gene in mantle-cell lymphomas. *Haematologica.* **92**(4):460-8.
- Roberts A.W., Kim C., Zhen L., Lowe J.B., Kapur R., Petryniak B., Spaetti A., Pollock J.D., Borneo J.B., Bradford G.B., Atkinson S.J., Dinauer M.C., Williams D.A. (1999) Deficiency of the hematopoietic cell-specific Rho family GTPase Rac2 is characterized by abnormalities in neutrophil function and host defense. *Immunity* **10**: 183-96.
- Roberts P. J. , Mitin N., Keller P. J., Chenette E. J., Madigan J. P., Currin R. O., Cox A. D., Wilson O., Kirschmeier P., and Der C. J. (2008) Rho Family GTPase Modification

- and Dependence on CAAX Motif-signaled Posttranslational Modification. *J Biol Chem.* **283**(37): 25150–25163.
- Robertson D., Paterson H.F., Adamson P., Hall A., Monaghan P. (1995) Ultrastructural localization of ras-related proteins using epitope-tagged plasmids. *J Histochem Cytochem.* **43**(5):471-80.
- Rocheleau C. E., Downs W. D., Lin R., Wittmann C., Bei Y., Cha Y. H., Ali M., Priess J. R. and Mello C. C. (1997). Wnt signaling and an APC-related gene specify endoderm in early *C. elegans* embryos. *Cell* **90**, 707-716.
- Rual J.F., Ceron J., Koreth J., Hao T., Nicot A.S., Hirozane-Kishikawa T., Vandenhoute J., Orkin S.H., Hill D.E., van den Heuvel S., Vidal M. (2004) Toward improving *Caenorhabditis elegans* phenome mapping with an ORFeome-based RNAi library. *Genome Res.* **14**(10B):2162-8.
- Rubin E.J., Gill D.M., Boquet P., Popoff M.R. (1988) Functional modification of a 21-kilodalton G protein when ADP-ribosylated by exoenzyme C3 of *Clostridium botulinum*. *Mol Cell Biol.* **8**(1):418-26.
- Saras J., Franzén P., Aspenström P., Hellman U., Gonez L.J., Heldin C.H. (1997) A novel GTPase-activating protein for Rho interacts with a PDZ domain of the protein-tyrosine phosphatase PTPL1. *J Biol Chem.* **272**(39):24333-8.
- Sawa M., Suetsugu S., Sugimoto A., Miki H., Yamamoto M., Takenawa T. (2003) Essential role of the *C. elegans* Arp2/3 complex in cell migration during ventral enclosure. *J Cell Sci.* **116**(8):1505-18.
- Schaefer L., Prakash S., Zoghbi H.Y. (1997) Cloning and characterization of a novel rho-type GTPase-activating protein gene (ARHGAP6) from the critical region for microphthalmia with linear skin defects. *Genomics* **46**(2):268-77.
- Schenck A., Bardoni B., Moro A., Bagni C., Mandel J.L. (2001) A highly conserved protein family interacting with the fragile X mental retardation protein (FMRP) and displaying selective interactions with FMRP-related proteins FXR1P and FXR2P. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(15):8844-9.
- Scherle P., Behrens T., and Staudt L.M. (1993) Ly-GDI, a GDP-dissociation inhibitor of the RhoA GTP-binding protein, is expressed preferentially in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci.* **90**(16): 7568–7572.
- Schmidt A. and Hall A. (2002) Guanine nucleotide exchange factors for Rho GTPases: turning on the switch. *Genes & Dev.* **16**: 1587-1609.
- Schmutz C., Stevens J., Spang A. (2007) Functions of the novel Rho GAP proteins RGA-3 and RGA-4 in the germ line and in the early embryo of *C. elegans*. *Development.* **134**(19):3495-505.
- Schnabel R. and Priess J. R. (1997). Specification of cell fates in the early embryo. In *C. elegans II* (ed. D. L. Riddle, T. Blumenthal, B. J. Meyer and J. R. Priess), pp. 361-382. Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schnelzer A., Prechtel D., Knaus U., Dehne K., Gerhard M., Graeff H., Harbeck N., Schmitt M., Lengyel E. (2000) Rac1 in human breast cancer: overexpression, mutation analysis, and characterization of a new isoform, Rac1b. *Oncogene* **19**: 3013-3020.
- Schonegg S., Constantinescu A.T., Hoegge C., Hyman A.A. (2007) The Rho GTPase-activating proteins RGA-3 and RGA-4 are required to set the initial size of PAR domains in *Caenorhabditis elegans* one-cell embryos. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **104**(38):14976-81.

- Schonegg S., Hyman A.A. (2006) CDC-42 and RHO-1 coordinate actomyosin contractility and PAR protein localization during polarity establishment in *C. elegans* embryos. *Development*. **133**(18):3507-16.
- Schultz J., Milpetz F., Bork P., Ponting C.P. (1998) SMART, a simple modular architecture research tool: identification of signaling domains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**(11): 5857-5864.
- Schwede T., Kopp J., Guex N., and Peitsch M.C. (2003) SWISS-MODEL: an automated protein homology-modeling server. *Nucleic Acids Res.* **31**(13): 3381-3385.
- Sekimata M., Kabuyama Y., Emori Y., Homma Y. (1999) Morphological changes and detachment of adherent cells induced by p122, a GTPase-activating protein for Rho. *J Biol Chem.* **274**(25):17757-62.
- Self A.J., and Hall A. (1995) Purification of recombinant Rho/Rac/G25K from *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **256**:3-10.
- Shindyalov I.N., and Bourne P.E. (1998), Protein structure alignment by incremental combinatorial extension (CE) of the optimal path. *Protein Eng.* **11**(9): 739-747.
- Shinohara M., Terada Y., Iwamatsu A., Shinohara A., Mochizuki N., Higuchi M., Gotoh Y., Ihara S., Nagata S., Itoh H., Fukui Y., Jessberger R. (2002) SWAP-70 is a guanine-nucleotide-exchange factor that mediates signalling of membrane ruffling. *Nature* **416**: 759-763.
- Simmer F., Moorman C., van der Linden A. M., Kuijk E., van den Berghe P. V., Kamath R. S., Fraser A. G., Ahringer J. and Plasterk R. H. (2003). Genome-wide RNAi of *C. elegans* using the hypersensitive rrf-3 strain reveals novel gene functions. *PLoS Biol* **1**, E12.
- Simske J.S. and Hardin J. (2001). Getting into shape: epidermal morphogenesis in *Caenorhabditis elegans* embryos. *Bioessays* **23**,12 -23.
- Spencer A.G., Orita S., Malone C.J., and Han M. (2001). A RHO GTPase-mediated pathway is required during P cell migration in *Caenorhabditis elegans*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 13132-13137.
- Steven R., Kubiseski T.J., Zheng H., Kulkarni S., Mancillas J., Ruiz Morales A., Hogue C.W., Pawson T., and Culotti J. (1998). UNC-73 activates the Rac GTPase and is required for cell and growth cone migrations in *C. elegans*. *Cell* **92**, 785-795.
- Strumane K., Rygiel T., van der Valk M., Collard J.G. (2009) Tiam1-deficiency impairs mammary tumor formation in MMTV-c-neu but not in MMTV-c-myc mice. *J Cancer Res Clin Oncol.* **135**(1):69-80.
- Sugai M., Hatazaki K., Mogami A., Ohta H., Pérès S.Y., Héroult F., Horiguchi Y., Masuda M., Ueno Y., Komatsuzawa H., Suginaka H., Oswald E. (1999) Cytotoxic necrotizing factor type 2 produced by pathogenic *Escherichia coli* deamidates a gln residue in the conserved G-3 domain of the rho family and preferentially inhibits the GTPase activity of RhoA and rac1. *Infect Immun.* **67**(12):6550-7.
- Sulston J.E., Schierenberg E., White J.G., Thomson J.N. (1983) The embryonic cell lineage of the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Dev Biol.* **100**(1):64-119.
- Suwa H., Ohshio G., Imamura T., Watanabe G., Arii S., Imamura M., Narumiya S., Hiai H., Fukumoto M. (1998) Overexpression of the rhoC gene correlates with progression of ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Br J Cancer* **77**: 147-152.

- Symons M., Derry J.M., Karlak B., Jiang S., Lemahieu V., McCormick F., Francke U. and Abo A. (1996) Wiskott–Aldrich syndrome protein, a novel effector for the GTPase CDC42Hs, is implicated in actin polymerization. *Cell* **84**: 723–734.
- Takai Y., Sasaki T., Matozaki T. (2001) Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev.* **81**(1):153-208.
- Tao W., Pennica D., Xu L., Kalejta R.F., and Levine A.J. (2001). *Wrch-1*, a novel member of the *Rho* gene family that is regulated by Wnt-1. *Genes Dev.* **15**: 1796–1807.
- Tapon N., Nagata K.-i., Lamarche N. and Hall A. (1998) A new Rac target POSH is an SH3-containing scaffold protein involved in the JNK and NF- κ B signalling pathways. *EMBO J.* **17**: 1395–1404.
- Tcherkezian J., Lamarche-Vane N. (2007) Current knowledge of the large RhoGAP family of proteins, *Biol Cell.* **99**(2):67-86.
- Teramoto H., Coso O., Miyata H., Igishi T., Miki T. and Gutkind S. (1996) Signaling from the small GTP-binding proteins Rac1 and Cdc42 to the c-Jun N-terminal kinase/stress-activated protein kinase pathway. *J. Biol. Chem.* **271**: 27225–27228.
- Threadgill R., Bobb K., Ghosh A. (1997) Regulation of dendritic growth and remodeling by Rho, Rac, and Cdc42. *Neuron.* **19**(3):625-34.
- Timmons L., Court D. L. and Fire A. (2001). Ingestion of bacterially expressed dsRNAs can produce specific and potent genetic interference in *Caenorhabditis elegans*. *Gene* **263**, 103-112.
- Timmons L. and Fire A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**, 854.
- Touré A., Dorseuil O., Morin L., Timmons P., Jégou B., Reibel L., Gacon G. (1998) MgcRacGAP, a new human GTPase-activating protein for Rac and Cdc42 similar to *Drosophila rotundRacGAP* gene product, is expressed in male germ cells. *J Biol Chem.* **273**(11):6019-23.
- Turcotte S., Desrosiers R.R., Beliveau R. (2003) HIF-1 α mRNA and protein upregulation involves Rho GTPase expression during hypoxia in renal cell carcinoma. *J Cell Sci* **116**: 2247-2260.
- van Golen K.L., Wu Z.F., Qiao X.T., Bao L., Merajver S.D. (2000) RhoC GTPase overexpression modulates induction of angiogenic factors in breast cells. *Neoplasia* **2**: 418-425.
- Walker K., Olson M.F. (2004) Targeting Ras and Rho GTPases as opportunities for cancer therapeutics. *Current Op Gen. & Dev.* **15**:62–68.
- Watanabe N., Madaule P., Reid T., Ishizaki T., Watanabe G., Kakizuka A., Saito Y., Nakao K., Jockusch B.M. and Narumiya S. (1997) p140mDia, a mammalian homolog of *Drosophila diaphanous*, is a target protein for Rho small GTPase and is a ligand for profilin. *EMBO J.* **16**: 3044–3056.
- Wennenberg K., Rossman K. L., Der C.J. (2005) The Ras superfamily at a glance. *J Cell Sc* **118**: 843-846.
- Williams B.D. and Waterston R.H. (1994). Genes critical for muscle development and function in *Caenorhabditis elegans* identified through lethal mutations. *J. Cell Biol.* **124**(4): 475–490.
- Williams-Masson E.M., Malik A.N., and Hardin J. (1997). An actin-mediated two-step mechanism is required for ventral enclosure of the *C. elegans* hypodermis. *Development* **124**: 2889–2901.

- Wissmann A., Ingles J., and Mains P.E. (1999). The *Caenorhabditis elegans mel-11* myosin phosphatase regulatory subunit affects tissue contraction in the somatic gonad and the embryonic epidermis and genetically interacts with the Rac signaling pathway. *Dev. Biol.* **209**(1): 111–127.
- Wissmann A., Ingles J., McGhee J.D., and Mains P.E. (1997). *Caenorhabditis elegans* LET-502 is related to Rho-binding kinases and human myotonic dystrophy kinase and interacts genetically with a homolog of the regulatory subunit of smooth muscle myosin phosphatase to affect cell shape. *Genes Dev.* **11**: 409–422.
- Worthylake R.A., Lemoine S., Watson J.M., Burrridge K. (2001) RhoA is required for monocyte tail retraction during transendothelial migration. *J Cell Biol.* **154**(1):147–60.
- Wu Y.C., Cheng T.W., Lee M.C., and Weng N.Y. (2002). Distinct rac activation pathways control *Caenorhabditis elegans* cell migration and axon outgrowth. *Dev. Biol.* **250**, 145–155.
- Xue Y., Bi F., Zhang X., Zhang S., Pan Y., Liu N., Shi Y., Yao X., Zheng Y., Fan D. (2006) Role of Rac1 and Cdc42 in hypoxia induced p53 and von Hippel-Lindau suppression and HIF1alpha activation. *Int J Cancer.* **118**(12):2965-72.
- Yamamoto M., Marui N., Sakai T., Morii N., Kozaki S., Ikai K., Imamura S., Narumiya S. (1993) ADP-ribosylation of the rhoA gene product by botulinum C3 exoenzyme causes Swiss 3T3 cells to accumulate in the G1 phase of the cell cycle. *Oncogene* **8**: 1449-1455.
- Yang N., Higuchi O., Ohashi K., Nagata K., Wada A., Kangawa K., Nishida E., Mizuno K. (1998) *Nature.* **393**(6687):809-12.
- Yang Y., Hentati A., Deng H.X., Dabbagh O., Sasaki T., Hirano M., Hung W.Y., Ouahchi K., Yan J., Azim A.C., Cole N., Gascon G., Yagmour A., Ben-Hamida M., Pericak-Vance M., Hentati F. and Siddique T. (2001) The gene encoding alsin, a protein with three guanine-nucleotide exchange factor domains, is mutated in a form of recessive amyotrophic lateral sclerosis. *Nat. Genet.* **29**: 160–165.
- Zalcman G., Closson V., Camonis J., Honore N., Rousseau-Merck M.F., Tavitian A., Olofsson B. (1996) RhoGDI-3 is a new GDP dissociation inhibitor (GDI). Identification of a non-cytosolic GDI protein interacting with the small GTP-binding proteins RhoB and RhoG. *J Biol Chem* **271**: 30366-30374.
- Zalcman G., Closson V., Linares-Cruz G., Lerebours F., Honoré N., Tavitian A., Olofsson B. (1995) Regulation of Ras-related RhoB protein expression during the cell cycle. *Oncogene* **10**(10):1935-45.
- Zhang B., Zhang Y., Shacter E., Zheng Y. (2005) Mechanism of the guanine nucleotide exchange reaction of Ras GTPase--evidence for a GTP/GDP displacement model. *Biochemistry.* **44**(7):2566-76.
- Zhuge Y., Xu J. (2001) Rac1 mediates type I collagen-dependent MMP-2 activation. role in cell invasion across collagen barrier. *J Biol Chem* **276**: 16248-16256.